

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Irena Vančurová

Ustavení a charakterizace nové myelomové buněčné linie ÚHKT-893 závislé na IL-6

Establishment and characterization of novel IL-6-dependent myeloma cell line
ÚHKT-893

Diplomová práce

Školitel: Doc. RNDr. Petr Stöckbauer, CSc.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 29.8.2011

Irena Vančurová

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Petru Stöckbauerovi, CSc. za vedení mé diplomové práce, cenné odborné rady, laskavý humor a nekonečný optimismus. Mé díky také patří Mgr. Lence Uherkové, Ph.D., která mě mnoho naučila, vždy podporovala a byla neustále nablízku nejen při práci vědecké. Dále děkuji Mgr. Iloně Vyhlídalové a paní Jitce Němcové za neméně cenné rady a pomocnou ruku při mé práci v laboratoři. Děkuji také řediteli Ústavu hematologie a krevní transfúze profesoru MUDr. Marku Trněnému, CSc. a vedoucí oddělení buněčné biochemie RNDr. Kateřině Kuželové, Ph.D. za umožnění vypracování této práce v laboratořích ústavu.

Nebylo by však studia nebylo-li by lásky a podpory ze stran mých rodičů. Děkuji.

Abstrakt

Mnohočetný myelom je nevléčitelné nádorové onemocnění plasmatických buněk lidí vyššího věku. Studium této nemoci se zabývají výzkumné týmy na celém světě. Permanentní buněčné linie jsou nepostradatelným nástrojem pro základní i aplikovaný výzkum. Jejich ustavení je ovšem nesnadné s velmi nízkou úspěšností. Z 96 primárních kultur buněk kostní dřeně pacientů s mnohočetným myelomem byla založena jedna nová myelomová linie ÚHKT-893. Tato linie pochází z buněk kostní dřeně 57leté pacientky s myelomem izotypu IgG_k v relapsu. Dnes je linie v prosperující kultuře již déle než 1 rok, avšak je závislá na interleukinu-6 (IL-6). Byly u ní sledovány růstové charakteristiky v médiu s IL-6 i bez něho. Byl získán základní profil povrchových antigenů pomocí imunofluorescence. Současná exprese povrchových molekul CD138 a CD38 potvrdila, že se jedná o plasmatické buňky.

Ustavení nové myelomové linie ÚHKT-893 s charakterem maligních plasmatických buněk tak rozšiřuje řadu existujících myelomových linií jako modelů pro studium tohoto zhoubného krevního onemocnění, vývoj a testování protinádorových vakcín a dalších cílených terapeutik.

Klíčová slova

Buněčná linie, mnohočetný myelom, plasmatické buňky, monoklonální imunoglobulin, interleukin-6.

Abstract

Multiple myeloma is an incurable fatal neoplasm of plasma cells affecting mainly elderly people. There are many research laboratories in the world where multiple myeloma is studied. Permanent cell lines are indispensable tools for both basic and applied research. However, the establishment of new cell lines is difficult with poor success. We established 96 primary cultures of bone marrow samples from myeloma patients. Only one culture succeeded in permanent myeloma cell line. The novel plasmacytic cell line ÚHKT-893 was established from bone marrow sample of 57 years old female relapsed with multiple myeloma of IgG κ isotype. The cell line is however dependent on the continuous presence of interleukin-6 in culture media. ÚHKT-893 cells grow continuously already more than 1 year. The growth of cells was regularly monitored according to growth curves and by measurement of cell viability. Surface antigenic profile was repeatedly determined by flow cytometry. The simultaneous expression of both CD138 and CD38 surface molecules confirmed the plasma cell origin of cells.

The establishment of the ÚHKT-893 myeloma cell line will extend the panel of existing myeloma cell lines as a new *ex vivo* model for the study of the etiology and pathogenesis of multiple myeloma. It will also provide the source of new material for the development, design and testing of cancer vaccines and other new targeted therapeutics of this devastating neoplastic disease.

Keywords

Cell line, multiple myeloma, plasma cells, monoclonal immunoglobulin, interleukin-6.

Obsah

1	Úvod.....	10
1.1	Mnohočetný myelom.....	10
1.1.1	Historie mnohočetného myelomu.....	10
1.1.2	Léčba.....	12
1.2	V hlavní roli plasmatické buňky.....	13
1.2.1	Imunoglobuliny.....	13
1.2.2	Vývoj B lymfocytů.....	15
1.2.3	Plasmatické buňky.....	17
1.3	Buněčné linie.....	19
1.3.1	Výhody a užitek buněčných linií.....	19
1.3.2	Stručný historický přehled (nejen) myelomových linií.....	20
1.3.3	Ustavení nové buněčné linie.....	22
1.3.4	EBV+ B-lymfoblastoidní buněčné linie.....	22
2	Cíle.....	24
3	Materiál a metody.....	25
3.1	Buněčné kultury.....	25
3.1.1	Buňky izolované z kostní dřeně pacientů.....	25
3.1.2	Vzorek č. 893.....	25
3.1.3	Buněčné linie.....	25
3.1.4	Kultivační médium.....	26
3.1.5	Kultivace buněk.....	27
3.1.6	Zmrazování buněk.....	27
3.1.7	Vyloučení přítomnosti EBV.....	27
3.2	Morfologická charakterizace.....	27
3.3	Počítání buněk a tvorba růstových křivek.....	28

3.3.1	Počítání v Bürkerově komůrce	28
3.3.2	Sledování dynamiky růstu linie ÚHKT-893	29
3.4	Pokus o získávání linie ÚHKT-893 nezávislé na IL-6.....	30
3.4.1	Kultivace v médiu bez IL-6	30
3.4.2	Postupné snižování koncentrace IL-6 v médiu	30
3.5	Průkaz imunoglobulinů	30
3.5.1	Průkaz sekrece imunoglobulinů.....	30
3.5.2	Proteinová analýza na hmotnostním spektrometru.....	31
3.6	Průkaz povrchových antigenů imunofluorescenčním značením.....	32
3.7	Měření senescence.....	34
3.8	Použité přístroje.....	35
4	Výsledky	36
4.1	Kultivace buněk kostní dřeně	36
4.2	Ustavení myelomové linie ÚHKT-893	39
4.3	Morfologie buněk ÚHKT-893	43
4.4	Dynamika růstu ÚHKT-893.....	44
4.5	Pokus o získání buněčné linie ÚHKT-893 nezávislé na IL-6	45
4.5.1	Kultivace v médiu bez IL-6	45
4.5.2	Postupné snižování koncentrace IL-6 v médiu	46
4.6	Sekrece imunoglobulinů.....	49
4.7	Charakterizace povrchových antigenů buněčné linie ÚHKT-893	50
4.8	Zjišťování míry senescence buněk ÚHKT-893.....	62
5	Diskuze.....	64
6	Závěr	69
7	Literatura	70

Seznam zkratek

2-D	dvourozměrná (two-dimensional)
ACN	acetonitril
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
APC	buňka prezentující antigen (antigen-presenting cell)
ASCT	autologní transplantace kmenových buněk (autologous stem cell transplantation)
BCR	B-buněčný receptor (B cell receptor)
B-LCL	B-lymfoblastoidní buněčná linie (B-lymphoblastoid cell line)
C	konstantní (constant)
CD	diferenciační antigen (cluster of differentiation)
CLL	chronická lymfocytární leukemie
CLP	běžný progenitor lymfocytů (common lymphocyte progenitor)
CML	chronická myeloidní leukémie
D	různorodost (diversity)
DC	dendritická buňka (dendritic cell)
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribunkleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DTT	dithiotreitol
EBV	virus EB/Epstein-Barrové (Epstein-Barr virus)
FBS	fetální bovinní sérum
FS	přední rozptyl (forward scatter)
G-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů (granulocyte colony-stimulating factor)
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (granulocyte-monocyte colony-stimulating factor)
GMean	geometrický průměr
H	těžký (heavy)
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie (high pressure liquide chromatography)
HSCs	hematopoetické kmenové buňky (hematopoetic stem cells)
Ig	imunoglobulin

IL	interleukin
J	spojovací (joining)
L	lehký (light)
MGUS	monoklonální gamapatie neznámého významu (monoclonal gammopathy of unknown significance)
MM	mnohočetný myelom (multiple myeloma)
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
NK	přirozený zabíječ (natural killer)
PBPC	progenitorové buňky periferní krve (peripheral blood progenitor cells)
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PCL	plasmocelulární leukemie (plasma cell leukemia)
PCR	polymerázová řetězcová reakce (polymerase chain reaction)
PE	fykoerytrin (phycoerytrin)
PTLD	potransplantační lymfoproliferativní choroba (post-transplant lymphoproliferative disorder)
SDS	dodecylsulfát sodný (sodium dodecyl sulphate)
SLC	náhradí lehký řetězec (surrogate light chain)
SMM	doutnající mnohočetný myelom (smouldering multiple myeloma)
SS	boční rozptyl (side scatter)
TdT	terminální deoxyribonukleotidyl transferáza
TFA	trifluoroctová kyselina (trifluoroacetic acid)
TGF β	transformující růstový faktor β (transforming growth factor β)
TNF α	faktor nekrotizující nádory α (tumor necrosis factor α)
V	variabilní

1 Úvod

1.1 Mnohočetný myelom

Mnohočetný myelom (MM) je nevléčitelné nádorové onemocnění plasmatických buněk. Ačkoliv představuje jen 10% hematologických malignit, jedná se o onemocnění relativně vzácné, protože mezi všemi nádorovými onemocněními tvoří jen 1%. V České republice jsou ročně diagnostikovány přibližně čtyři stovky nově nemocných ve věku průměrně 60 let a více.¹ Přestože se tedy jedná o nemoc vyššího věku, dnes už nejsou žádnou výjimkou ani pacienti kolem 40 let. Charakteristickými projevy MM jsou řídnutí kostí, hyperkalcemie, cytopenie a výskyt monoklonálního (M) proteinu neboli tzv. paraproteinu (jedná se o monoklonální imunoglobulin (Ig) nebo jen jeho lehký (L; light) řetězec produkovaný maligními klony plasmatických buněk) v séru a moči. Nejsou to však příznaky jediné, dále se často vyskytují poruchy koagulace, hyperviskózní syndrom a renální insuficience způsobená paraproteinem a další. Nedílnou součástí jsou pak poruchy imunity, především té humorální. MM může vzniknout *de novo* nebo se rozvine z benigního onemocnění monoklonální gamapatie neurčitého významu (MGUS; monoclonal gammopathy of undetermined significance), které je charakterizováno menším množstvím sérového paraproteinu a klonálních plasmatických buněk v kostní dřeni včetně absence projevů typických pro MM popsanych výše. Zhruba se jedná o 1% pacientů s MGUS ročně, u kterých se rozvine MM nebo doutnající MM (SMM; smouldering multiple myeloma), který může být dalším mezičlánkem během vzniku MM.² SMM je charakterizován větším množstvím sérového paraproteinu a taktéž klonální expanzí plasmatických buněk v kostní dřeni, avšak orgánové postižení chybí. Pacient může s SMM přežívat léta bez léčby. Za rok se z 10-20% SMM rozvine MM.³

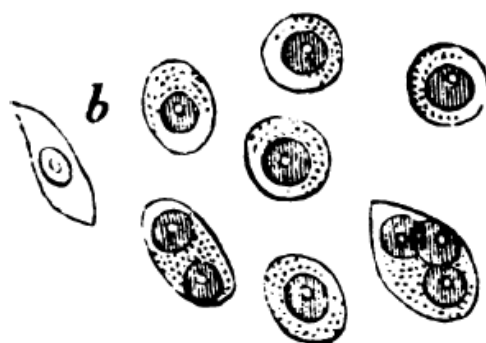
1.1.1 Historie mnohočetného myelomu

Mnohočetný myelom patří mezi nádorová onemocnění, která se v lidské populaci vyskytují pravděpodobně již po dlouhá tisíciletí.⁴ Prvním doloženým případem z moderní doby je případ Sarah Newbury, 39leté služebné z Londýna, který popsal Solly v roce 1844.⁵ Silné bolesti zad a divné pocity v pravé noze začala pociťovat v květnu 1840. O 2 roky později byla již tak zesláblá, že zůstala upoutaná na lůžko a o další 2 roky později zemřela po 5tídenní hospitalizaci v nemocnici. Její pitva odhalila četné zlomeniny mnoha kostí v těle, zdeformovaný hrudník, kde pravá plíce vykazovala pouze ¼ normální velikosti. Pozornost

upoutala hustá červená substance uvnitř velmi prořídých křehkých kostí. Její další zkoumání odhalilo množinu jaderných buněk se zřetelným oválným centrálním jádrem nebo méně často se dvěma zřetelnými jádry.

J. F. Keller popsal jako první v roce 1846 protein v moči, který precipitoval při zvyšování teploty lehce nad 50°C a při dalším zahřívání se precipitát opět ztrácel. Bence Jones popsal tytéž znaky u proteinu v moči váženého londýnského obchodníka McBeana, který podle všeho trpěl mnohočetným myelomem (kromě daného proteinu v moči se při pitvě ukázaly stejné kostní léze jako v případě Sarah Newbury).⁶ Bence Jones navíc pozoroval, že při ochlazování moči, protein opět precipituje. Navzdory tomu, že Bence Jones nebyl prvním, kdo objevil přítomnost proteinů v moči, tak díky tomu, že poukázal na jeho význam při diagnostice u pacientů se skeletálním onemocněním, se nesmazatelně vepsal do historie mnohočetného myelomu. Ovšem velikost tohoto objevu byla doceněna až po jeho smrti, neboť v jeho nekrologu není o proteinu nalezeném v moči, majícím specifické vlastnosti, ani zmínka⁷. Přesto nebylo toto pozorování zapomenuto. Už v roce 1880 nazval Fleischer protein v moči nemocných Bence Jonesovým proteinem.⁶

Dr. J. Dalrymple také vyšetřoval kosti McBeana. Věrně zakreslil podobu 1,5 – 2x větších buněk oproti erytrocytům obsažených v mazlavé kostní substanci, které měly kruhový či oválný charakter a často obsahovaly 2 někdy až 3 jádra (Obr. 1). Tento popis se také podobal popisu buněk, který provedl Sally v roce 1844.⁶



Obr. 1. Buňky obsažené v kostní dřeni McBeana. Zakreslil Dalrymple v roce 1846.⁸

V roce 1875 se Waldayer poprvé zmiňuje o tzv. plasmatických buňkách, avšak přesný popis přináší až R. Cajal o 15 let později. Roku 1900 popsal Wright onemocnění 54letého muže. Při pitvě se zaměřil na buňky z nádorů a usoudil, že tyto nádorové buňky jsou buňky plasmatické nebo buňky z nich vzniklé.⁶

Mnohočetný myelom byl označen také jako Kahlerova choroba podle případu nemocného Dr. Loose, který popsal česko-rakouský profesor Otto Kahler v roce 1889.^{6,9} Kahler popsal základní rysy onemocnění: kostní a renální postižení, opakované infekce, krvácivost, anémii.

Bayne-Jones a Wright Wilson popsali r. 1922 dvě různé populace Bence Jonesova proteinu.¹⁰ Dostaly název kappa a lambda na počest Korngolda a Lipariho v roce 1956, kteří ukázali, že antisérum proti Bence Jonesovému proteinu reaguje s myelomovými proteiny.¹¹ Na to, že se jedná o L řetězce imunoglobulinů, přišli Edelman a Gally v roce 1962, tedy 117 let od popisu unikátního chování Bence Jonesova proteinu při zahřívání a následném ochlazování. L řetězce monoklonálního IgG a Bence Jonesova proteinu, které získali od jednoho pacienta, měly shodnou aminokyselinovou sekvenci, podobné spektrofluorometrické vlastnosti, stejný výskyt na karboxymethylcelulózové chromatografii a na škrobové gelové elektroforéze, identické ultracentrifugační znaky, stejně jako termální rozpustnost a stejnou molekulovou hmotnost. Tyto L řetězce precipitovaly při zahřívání mezi 40°C a 60°C a následně se rozpustily při dalším zahřívání. Při ochlazování reprecipitovaly opět mezi 40°C a 60°C.¹² Stejně to popisovali už Heller a Bence Jones ve 40. letech 19. století u proteinu nalezeného v moči.

1.1.2 Léčba

V polovině 19. století byly Sarah Newbury podávány rebarborové prášky a pomerančová kůra.⁵ O 100 let později byl k léčbě MM podáván uretan, nicméně v polovině 60. let bylo pomocí testů s užitím placebo prokázáno, že nemá na MM žádný efekt.¹³ V roce 1958 byl poprvé zaznamenán přínos látky melfalanu při léčbě MM.¹⁴ Z řad kortikosteroidů se používají prednison a dexametazon. Kombinace melfalanu s prednisonem vykazuje už desítky let dobré výsledky v léčbě MM.¹⁵ Dalšími léčivými, které jsou využívány, jsou doxorubicin, vinkristin, thalidomid a cyklofosamid.

Jedním z hlavních nástrojů léčby MM je autologní transplantace kmenových buněk (ASCT; autologous stem-cell transplantation). Pacienti, kteří splňují podmínky k tomu, aby u nich mohla být provedena ASCT, prochází nejdříve několikaměsíční indukční léčbou, při které jsou používány různé kombinace chemoterapeutik, jako jsou thalidomid, dexametazon a další. Pokud pacienti nejsou ve stavu, kdy by mohli podstoupit ASCT, jsou často léčeni kombinací melfalanu s prednisonem. Podobných výsledků jako u ASCT bylo docíleno také dlouhodobou chemoterapií,¹⁶ avšak potíže spojené s jejím užíváním vč. četných vedlejších

účinků favorizují přistoupení k ASCT. Zvýšení efektivity léčby lze dosáhnout tzv. tandemovou ASCT, kdy pacient podstoupí druhou ASCT hned poté, co se zotaví z první.¹⁷ Své výhody má také alogenní transplantace. Jsou to absence nádorových buněk ve štěpu a působení štěpu proti myelomu. Avšak tato léčba je vhodná a uskutečnitelná jen pro 5-10% pacientů s MM. Riziko úmrtí pacienta je navíc vysoké a tudíž nepřijatelné. Jistou alternativou, zejména pro pacienty s nově diagnostikovaným MM, může být kombinace ASCT a následné alogenní transplantace od vhodného dárce.¹⁸

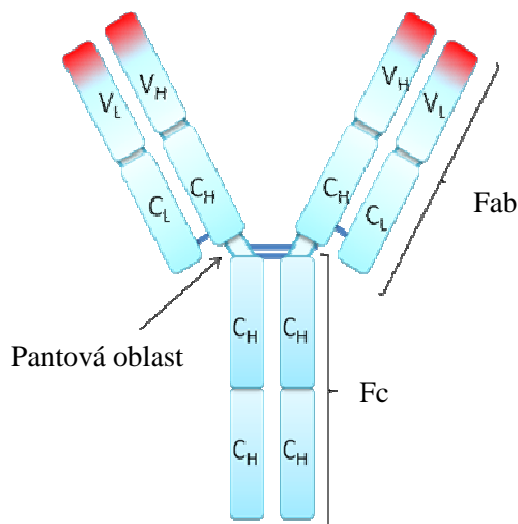
Thalidomid byl v 50. letech 20. století uveden na trh jako přípravek proti ranním nevolnostem v těhotenství. Záhy se však ukázalo, že má teratogenní účinky, a byl stažen z distribuce. Na konci 90. let se ukázalo, že thalidomid, který snižuje angiogenezi, má příznivý vliv na pacienty s MM.¹⁹ Thalidomid samotný nebo v kombinaci s dalšími látkami (dexametazon, cyklofosfamid, melfalan apod.) je součástí standardních protokolů léčby refrakterních MM nebo pacientů v relapsu. V posledních letech jsou vyvíjeny různé deriváty thalidomidu, které by měly lepší vlastnosti a byly méně cytotoxické pro buňky zdravých tkání. Nejvýraznější takovou látkou je lenalidomid. Novou kapitolu léčby nádorových onemocnění včetně MM otevřel výzkum inhibitorů proteazomu. Bortezomib je prvním takovým, který se zkouší v klinických testech. Více o léčbě MM v odpovídajících review.^{9,20,21}

1.2 V hlavní roli plasmatické buňky

Plasmatické buňky, jsou konečným diferenciacním stádiem vývoje B lymfocytů. Produkují specifické protilátky jako hlavní složky humorální imunity.

1.2.1 Imunoglobuliny

Dosavadní poznatky o imunoglobulinech přehledně uspořádal Schroeder H.W. et al.²² Na konci 19. století se poprvé začalo mluvit o protilátkách, substanci, která dokázala neutralizovat toxiny. Protilátky neboli imunoglobuliny (Obr. 2) jsou glykoproteiny exprimované na povrchu zralých i nezralých B lymfocytů a sekretované plasmatickými buňkami. Skládají se z 2 H (těžkých; heavy) řetězců a 2 L řetězců. Každý z řetězců má na svém NH₂-konci 1 variabilní (V) doménu a dále 1 nebo více domén konstantních (C; constant). Mezi 1. a 2. C_H doménou se nachází pantová oblast. Zde působí enzymy, kterými je možné molekulu Ig rozdělit. Papain štěpí Ig na 3 části: 2 Fab fragmenty a jeden Fc fragment. Pepsin rozdělí Ig na 2 části: F(ab)₂ fragment a Fc fragment. Některé domény jsou vzájemně propojené disulfidickými můstky.



Obr. 2. Struktura imunoglobulinu.

Oblast, kterou se Ig váže na antigen, se nazývá paratop, vázané místo na antigenu epitop. Jedinečné vazebné struktury uvnitř V domény říkáme idiotyp. Jednotlivé Ig se rozdělují do 5 základních skupin IgM, IgD, IgG, IgA, IgE a několika dalších podskupin (IgG₁₋₄, IgA₁₋₂). Souhrnně jsou nazývány izotypy. Liší se detaily ve struktuře C_H domén, jejich počtem (3 nebo 4), množstvím disulfidických můstků a mírou glykosylace. Rozlišujeme H řetězce μ , δ , γ , α a ϵ . L řetězce jsou pouze dva – κ a λ . Všechny Ig mohou být ve formě vázané na povrch B lymfocytu nebo ve formě sekretované do prostředí. Sekretované IgM a IgA tvoří polymery, které jsou spojené disulfidickými můstky a tzv. J řetězcem. Vlastnosti a funkce jednotlivých izotypů jsou uvedeny v tabulce 1.

Tvorba Ig začíná již v raných fázích vývoje B lymfocytů (kapitola 1.2.2). V domény Ig mají komplexní strukturu složenou z rámcových oblastí a oblastí určujících komplementaritu. Tyto oblasti jsou na DNA rozloženy do četných genových segmentů V, D (diversity) a J (joining), přičemž D segmenty jsou typické pouze pro H řetězce. Během vývoje dochází k tzv. V(D)J přeskupování, kdy dochází ke kombinacím mezi jednotlivými genovými segmenty tak, aby konečná DNA obsahovala z každé V, (D) a J oblasti pouze jeden genový segment. Ačkoli toto přeskupování genů maximálně zvyšuje zárodečnou variabilitu, hlavním zdrojem variability jednotlivých idiotypů jsou spojovací mechanismy během V(D)J přeskupování. Během nich může dojít ke ztrátě několika nukleotidů na každém konci přeskupovaného genu a následně k doplnění náhodnými nukleotidy, jejichž sekvence není zapsaná v DNA, pomocí terminální deoxyribonukleotidyl transferázy (TdT). Uplatňují se ještě další mechanismy, např. sestřih D segmentů aj.

Tab. 1. Vlastnosti a funkce jednotlivých imunoglobulinových izotypů. Převzato.²²

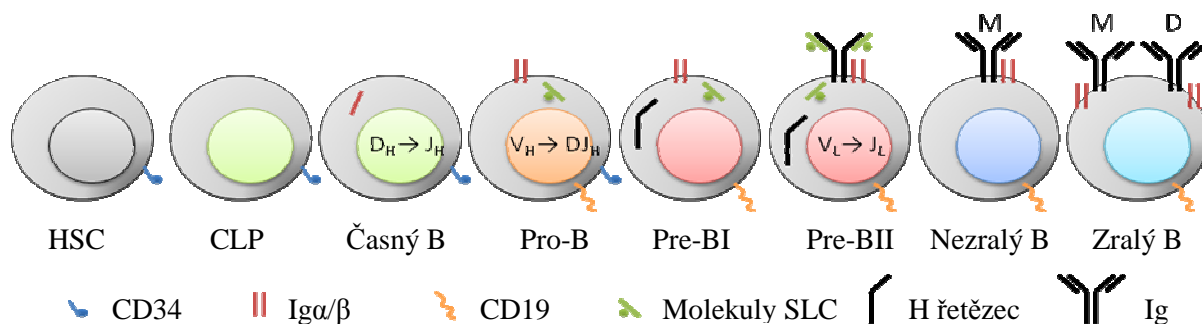
	Sérum (%)	Struktura	Vazba komplementu	Opsonizace	Další funkce
IgG	75	monomer	+	+++	sekundární odpověď, neutralizace toxinů a virů
IgG1	67% IgG	monomer	ano	ano	
IgG2	22% IgG	monomer	ano	ano	
IgG3	7% IgG	monomer	ano	ano	
IgG4	4% IgG	monomer	ne	ne	
IgM	10	pentamer	+++	+	primární odpověď
IgA	15	monomer, dimer	-	-	slizniční imunita
IgD	<0,5	monomer	-	-	homeostáza
IgE	<0,01	monomer	-	-	alergie, parazitární infekce

1.2.2 Vývoj B lymfocytů

B lymfocyty jsou malé buňky (6-12 μm) s kompaktním jádrem a minimem cytoplasmy. Z celkového počtu 2×10^{12} lymfocytů, které obsahuje lidské tělo, tvoří 5-15% právě B lymfocyty. Jsou jednou ze složek adaptivní imunity. Stejně jako ostatní leukocyty (bílé krvinky) vznikají z pluripotentních hematopoetických kmenových buněk (HSCs; hematopoietic stem cells). Hlavním znakem HSCs je molekula CD34. Zrání B lymfocytů (Obr. 3), které probíhá v kostní dřeni nebo v prenatálním období v játrech, je komplexní proces, který je řízen po sobě jdoucími změnami v genové expresi a podněty z vnějšího mikroprostředí.

Prvním stupínkem ke vzniku B lymfocytů jsou tzv. CLP buňky (common lymphocyte progenitor). Původní myšlenka, že se jedná o společný progenitor pro B, T, NK lymfocyty a dendritické buňky, je dnes diskutabilní.²³ CLP jsou CD10+, CD34+, CD19-. Za další mezistupeň můžeme považovat časně B lymfocyty, které jsou CD34+, CD10+, TdT+. Exprimují znaky typické pro B buněčnou linii Ig α (CD79a) a VpreB (součást náhradního lehkého řetězce) a začíná zde probíhat DJ_H přeskupování (první krok při vytváření povrchového Ig neboli B-buněčného receptoru - BCR; B-cell receptor). Pro-B lymfocyty

jsou charakterizovány CD34+, CD10+, CD19+, dále TdT+ a V-DJ_H přeskupováním. Lymfocyty, které úspěšně nedokončí VDJ_H přeskupování, hynou apoptózou. Lymfocyty, u kterých bylo VDJ_H úspěšné, označujeme jako pre-BI lymfocyty. Tyto pre-BI exprimují cytoplazmatický H imunoglobulinový řetězec μ , ale jsou CD34- a TdT-. Pre-BII lymfocyty jsou menší než pre-BI a na povrchu vystavují pre-BCR, který je složený ze dvou μ H řetězců a dvou náhradních řetězců SLC (surrogate light chain).²⁴ Vznik funkčního pre-BCR je důležitým kontrolním bodem ve vývoji B lymfocytů. Dochází k alelické exkluzi, která zajistí klonální specifitu pre-BCR. Pre-BCR je asociován se signálním heterodimerem Ig α/β . Signální dráhy pre-BCR spouští kaskády dějů vedoucích k intenzivnímu přeskupování genů pro L řetězce κ ev. λ a k následné proliferaci.²⁵ Nezralé B lymfocyty produkují funkční povrchový BCR třídy IgM. Patří sem i tzv. transientní B lymfocyty, které svým BCR vážou antigeny, které jsou nezávislé na pomoci T_H lymfocytů.²⁶ Současnou produkcí IgM a IgD jsou charakterizovány zralé B lymfocyty, které opouštějí kostní dřeň a putují na periferie a do sekundárních lymfoidních orgánů.



Obr. 3. Schéma vývoje B lymfocytů. B lymfocyty diferencují z pluripotentních HSCs řadou pochodů, které ovlivňují genovou expresi. Zde jsou znázorněna základní stádia vývoje B lymfocytů s nejdůležitějšími diferenciačními molekulami CD34, CD19, Ig α/β a funkčními Ig. Označena jsou stádia, ve kterých probíhá V(D)J přesmyk. Velikost buněk se během vývoje mění. Tyto změny zde nejsou ukázány. CLP: běžný progenitor lymfocytů, D: IgD, H: těžký, HSC: hematopoetická kmenová buňka, Ig: imunoglobulin, M: IgM, SLC: náhradní lehký řetězec.

Většina zralých B lymfocytů osidluje lymfoidní folikuly sleziny a mízních uzlin, kde se setkávají s antigeny na antigen-prezentujících buňkách (APCs; antigen presenting cells) – především na dendritických buňkách (DCs; dendritic cells). Takto aktivované B lymfocyty procházejí značnými změnami v expresi genů (shrnutí Oracki et al.²⁷), které vedou k somatickým hypermutacím a izotypovému přesmyku. Výsledkem jsou Ig s mnohonásobně vyšší afinitou k danému antigenu. Podrobnosti o vývoji B lymfocytů jsou k nalezení v odpovídajících review.²⁸⁻³⁰

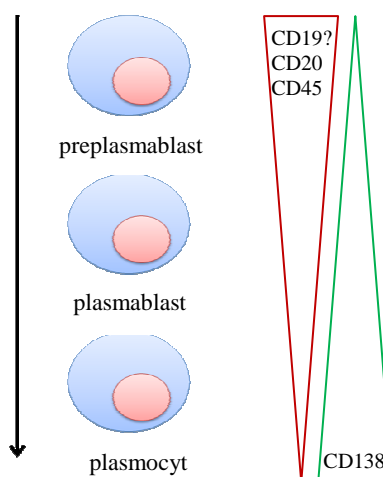
1.2.3 Plasmatické buňky

Zdraví jedinci mají ve své kostní dřeni asi 1-2% plasmatických buněk. Toto množství u pacientů s MM vzrůstá, často se pohybuje okolo 10%. Myelomové plasmatické buňky bývají nezhádka vícejaderné.

Hlavním diferenciačním znakem plasmatických buněk je molekula CD138 (syndecan-1).^{31,32} Patří do rodiny transmembránových heparan-sulfátových proteoglykanů a zajišťuje interakce s extracelulární matrix.^{33,34} V hematopoetickém systému se jedná o znak výlučně plasmatických buněk, ovšem dále je exprimován i na epiteliích a buňkách dalších tkání zdravých nebo maligních.³¹ CD38 je panleukocytární antigen a je využíván jako doplňkový znak k ověření, že se jedná skutečně o buňky krevní řady. Intenzita exprese CD38 u maligních plasmatických buněk je nižší než na normálních plasmatických buňkách.³⁵ Dalším znakem, který je u plasmatických buněk testován, je CD45. Hematopoetické buňky (kromě zralých erytrocytů a trombocytů) včetně svých prekurzorů exprimují na svém povrchu CD45.³⁶ Během vývoje plasmatických buněk se CD45 pomalu ztrácí a plně diferencované zralé buňky jsou charakterizované jako CD45-.³⁷ Výskyt CD19 na plasmatických buňkách je podle dostupné literatury nejednoznačný. CD19 je charakteristickým diferenciačním znakem B buněčné řady a pozitivně reguluje transdukcii signálu z BCR v B lymfocytech. Někteří autoři pokládají za obecně platné, že během vývoje plasmatických buněk postupně dochází ke konečné ztrátě CD19 (která postupuje více méně současně se ztrátou exprese CD45) na zralých plasmatických buňkách a z tohoto předpokladu vycházejí.³⁸⁻⁴¹ Jiní autoři ve svých člancích uvádějí (a další z toho vycházejí), že plasmatické buňky na svém povrchu běžně exprimují CD19, a pokud tomu tak není, je tento stav označován jako aberantní, protože mu odpovídají zejména plasmatické buňky pacientů s MGUS, MM a dalšími malignitami.^{35,42-45} Plasmatické buňky MM často vykazují silnou expresi CD56 (znak NK – natural killer – buněk) a dále v některých případech aberantní expresi CD117 a CD20.^{35,42,46} MM bez CD56 jsou spojené s agresivnějším průběhem nemoci.³² Normální plasmatické buňky bývají přitom CD56-, CD117- a CD20-.^{42,46}

Jak bylo popsáno výše, plasmatické buňky vznikají z aktivovaných B lymfocytů. Po své aktivaci se B lymfocyt začne zvětšovat, proliferovat a diferencovat v blast. Některé z těchto proliferujících B lymfocytů sekretují dokonce protilátky a nazýváme je plasmablasty. Jsou to větší buňky s velkým okrouhlým jádrem, které mají stále ještě znaky B lymfocytů a zároveň už vykazují ty, které jsou typické pro plasmatické buňky.²⁷ Vývojová stádia plasmatických buněk nejsou rozpracována tak podrobně jako u B lymfocytů. Většinou se pojednává o 3

stádiích, která se liší právě v postupné ztrátě B lymfocytárních znaků^{39,47} (Obr. 4). Někteří autoři hovoří namísto preplasmablastů, plasmablastů a plasmocytů o primitivních nezralých, nezralých a zralých plasmatických buňkách. Toto dělení by mělo být ekvivalentní.



Obr. 4. Schéma vývoje plasmatických buněk.

Plasmatické buňky můžeme rozlišit podle délky života na krátce žijící a dlouho žijící (shrnují Oracki et al. a Chu et al.^{27,48}). Dlouho žijící plasmatické buňky kostní dřeně jsou zdrojem protektivních cirkulujících protilátek. To, zdali se aktivovaný B lymfocyt přemění v dlouho žijící plasmatickou buňku, záleží na podstatě antigenu který rozpoznal, aktuální lokalizaci, povrchových znacích, aktivních transkripčních faktorech a signálech z vnějšího prostředí (cytokiny aj.). Dlouho žijící plasmatické buňky vznikají v zárodečných centrech lymfoidních folikulů, kde během sekundární reakce imunitní odpovědi původní B lymfocyt rozeznal antigen na folikulárních dendritických buňkách a prošel afinitní maturací. Takto vzniklé plasmablasty, které ještě exprimují část B lymfocytárních znaků a zároveň už sekretují vysokoafinní protilátky proti danému antigenu, jsou pravděpodobně prekurzory dlouho žijících plasmocytů v kostní dřeni.⁴⁹ Nové plasmablasty pak migrují do kostní dřeně. Sem jsou atrahované chemokiny produkovanými stromálními buňkami kostní dřeně např. CXCL12.⁵⁰ Specifické mikroprostředí kostní dřeně, které vytváří tamní stromální buňky stojí pravděpodobně za jejich schopností přežít zde po mnoho měsíců až let. Mezi faktory tvořící toto mikroprostředí patří IL-6, CXCL12, ligand CD44, GM-CSF (faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů; granulocyte-monocyte colony-stimulating factor), TGF- β (transformující růstový faktor β ; transforming growth factor β) a TNF α (faktor nekrotizující nádory α ; tumor necrosis factor α).^{51,52} Samotné plasmatické buňky vyžadují k přežití přímý kontakt se stromálními buňkami. Tato interakce zpětně vyvolává produkci IL-6 ve stromálních buňkách.⁵¹ IL-6 byl objeven mezi růstovými a diferenačními faktory pro

B lymfocyty na začátku 80. let. Uplatňuje se během pozdních fází vývoje B lymfocytů tj. jejich diferenciaci v plasmatické buňky.^{53,54} IL-6 je růstovým a proliferačním faktorem a faktorem přežití nejen pro plasmatické buňky,^{55,56} ale také zároveň pro buňky myelomové.^{57,58}

1.3 Buněčné linie

Jako buněčné linie se označují buňky, které jsou schopny nepřetržitého růstu a dělení v kultuře *ex vivo*. V živém organismu mají tuto schopnost kmenové buňky, které dávají vzniknout mnoha dalším typům buněk. Diferencované buňky tkání mají omezenou délku života. Jsou-li z těchto buněk založené kultury *ex vivo*, říkáme jim primární kultury. Buňky krátkodobých primárních kultur přežívají pouze několik málo dnů nebo i týdnů a rozdělí se méně než 10x. V dlouhodobých primárních kulturách jsou buňky kultivovány až několik měsíců. Jejich proliferační hranice je 50x-60x. Buňky, které mají z různých důvodů porušené kontrolní mechanismy buněčného cyklu (např. nádorové buňky nebo buňky transformované viry), se mohou dostat za tuto pomyslnou mez a začít se neomezeně dělit. Pokud se rozdělí >150-200x resp. jsou-li přítomné v kontinuální buněčné kultuře >1 rok, hovoříme o tzv. immortalizovaných buňkách, které tvoří permanentní buněčné linie.^{59,60} Buněčné linie mohou být adherentní, které rostou přichycené k podkladu, nebo suspenzní, tedy volně plovoucí v médiu. Hematopoetické buněčné linie jsou převážně suspenzní.

1.3.1 Výhody a užitek buněčných linií

Tab. 2. Výhody a klíčové vlastnosti hematopoetických buněčných linií. Převzato.⁵⁹

Hlavní výhody:

- neomezený zdroj buněčného materiálu
- celosvětová dostupnost identického buněčného materiálu
- možnost nekonečného skladování v tekutém dusíku
- nepřítomnost kontaminujících normálních buněk

Klíčové vlastnosti:

- monoklonální původ
 - zastavení v určitém stupni vývoje
 - zachovaná schopnost proliferace v kultuře
 - stabilita většiny vlastností v dlouhodobých kulturách
 - specifické genetické změny
 - zachování exprese nádorových genů
-

Permanentní buněčné linie jsou nepostradatelným modelovým systémem pro základní i aplikovaný výzkum. Hematopoetické buněčné linie slouží pro výzkum leukémií a lymfomů na buněčné a molekulární úrovni. Pro studium buněčné diferenciaci, proliferace a apoptózy jsou prakticky nenahraditelné. Dále slouží jako reprodukovatelné standardy pro cytogenetické a molekulárně biologické studie leukémií. Výhody a klíčové vlastnosti těchto linií jsou uvedeny v tabulce 2.

1.3.2 Stručný historický přehled (nejen) myelomových linií

Existence buněčných kultur je známá už více jak sto let. V roce 1951 byla v Marylandu v USA ustavena první permanentní linie z lidských buněk. Tato buněčná linie HeLa pocházela od pacientky s karcinomem děložního čípku.⁶¹ O 4 roky později se Osgood a Brooke těšili z ustavení první lidské hematopoetické buněčné linie J-111, která byla získána z pacienta s AML.⁶² Ve skutečnosti se ale jednalo o HeLa buňky a tedy jeden z prvních případů buněčné kontaminace mezi kulturami.⁶³ Skutečně prvními permanentními buněčnými liniemi, které byly získané z hematopoetických buněk z biopsií pacientů z Afriky s Burkittovým lymfomem, byly v roce 1963 série linií, z nichž nejznámější je linie Raji.⁶⁴ Jakýsi „boom“ vzniku nových hematopoetických buněčných linií nastal v mezidobí počátku let 80. a 90. Největšími producenty byly vědecké týmy z Japonska.⁵⁹

První myelomovou linií, která byla ustavena v roce 1966 a zapsala se tak do historie, byla RPMI 8226.⁶⁵ Buňky byly získány z periferní krve 61letého muže s diagnózou MM (IgG λ). Druhou v pořadí byla linie U-266 z roku 1968.⁶⁶ Ustavena byla z buněk periferní krve 53letého muže s refrakterním MM v terminálním stádiu. Jedná se o naprosto jedinečnou myelomovou linii, protože jako jediná ze všech myelomových linií, které byly dodnes ustaveny, sekretuje IgE λ . U-266 je nejvíce rozšířenou myelomovou linií. V tabulce 3 jsou abecedně seřazeny všechny permanentní myelomové linie, které byly do této doby ustaveny, a jejich základní charakteristika. Tabulka 3 byla sestavena podle přehledu Drexlera⁵⁹ z roku 2010. Nejsou v ní uvedeny sesterské linie, které, pokud byly ustaveny, byly původem ze stejného pacienta, ale jiného vzorku, a také chybí myelomová linie z ledna 2011. Tato linie MSG1 byla získána z pleurální efúze od pacienta s MM (IgA λ). Fenotyp linie je CD38+, CD138+, CD19-. MSG1 je plně závislá na podpoře stromálních buněk nebo fibronektinu a na IL-6.⁶⁷

Tab. 3. Přehled doposud ustanovených linií z mnohočetného myelomu. Podle Drexlera.⁵⁹ Asc. – ascitus, KD – kostní dřev, kons. – konstitutivně, N – neznámý údaj, pc. – plasmacytom, PK – periferní krev, pl. e. – pleurální efúze, sacr. – sakrální, sbct. – subkutánní, sekr. – sekretující, stim. – stimulovaný, U – žádný stanovený, záv. – závislý.

	Název	Doba zdvojení	Vir. status	IL-6	CD19	CD38	CD138	HLA - DR	Izotyp	Původ vzorku
1	ACB-885	30-35	EBV-	-	N	+	N	-	IgGκ	pl.e.
2	ANBL-6	N	EBV-	záv.	-	+	N	+	Igλ	PK
3	CMA-03	80	EBV-	záv.	-	+	+	N	IgGκ	pl.e.
4	CZ-1	48	EBV-	-	-	+	+	N	Igλ	PK nebo KD
5	delta-47	40	EBV-	-	-	+	N	-	IgDλ	asc.
6	DOBIL-6	36	EBV-	stim., sekr.	+	+	N	+	IgG	KD
7	EJM	60-72	EBV-	stim.	N	+	N	+	IgGλ	asc.
8	Fravel	62	EBV-	-	+	N	N	+	IgGκ	KD
9	HL461	50	EBV-	-	+	+	N	+	IgGκ	KD
10	Karpas 417	N	EBV-	-	-	+	(+)	-	IgGκ	PK
11	Karpas 707	48-72	EBV-	-	N	N	N	N	IgGλ	PK nebo KD
12	Karpas 929	N	EBV-	-	-	+	+	-	IgGλ	KD
13	KAS-6/1	N	EBV-	mRNA+, záv., stim.	-	+	N	N	IgGκ	PK
14	KMM-1	36-40	EBV-	-	-	+	N	-	Igλ	sbct. pc.
15	KMS-11	36	EBV-	stim.	N	(+)	N	-	IgGκ	pl.e.
16	KMS-12-BM	56-60	EBV-	-	-	+	+	(+)/-	U	KD
17	KMS-18	72	EBV-	-	-	-	N	+	IgAλ	KD
18	KMS-21-PE	20	EBV-	sekr.	-	+	N	N	IgDλ	pl.e.
19	KPC-32	5-6d	EBV-	-	-	+	N	-	Igλ	KD
20	KPMM2	48	EBV-	záv., sekr.	-	+	N	-	IgGλ	asc.
21	KYdelta-1	24-36	N	-	-	+	N	+	IgGκ	pl.e.
22	LB 84-1	34	EBV-	-	+	+	N	+	IgAλ	KD
23	LB-831	38	EBV-	-	N	N	N	+	IgGκ	pl.e.
24	LOPRA-1	30	EBV-	-	-	+	N	-	IgAκ	asc.
25	LP-1	50	EBV-	-	-	+	+	+	IgGλ	PK
26	MEF-1	36	EBV-	sekr.	-	-	N	-	Igκ	KD
27	MM.1	72	EBV-	-	-	+	+	-	IgAλ	PK
28	MM5.1	N	EBV-	-	-	+	+	-	IgAκ	KD
29	MM17	72	EBV-	-	-	+	+	N	IgGκ	sacr. pc.
30	MOLP-2	72-96	EBV-	-	+	+/-	+	+	IgDλ	PK
31	MOLP-5	48	EBV-	stim.	-	+	+	-	Igκ	PK
32	MOLP-6	48	EBV-	stim.	-	-	N	N	IgAκ	PK
33	MOLP-8	40-48	EBV-	-	-	+	+	-	IgDλ	PK
34	NCI-H929	50	EBV-	-	-	+	+	-	IgAκ	pl.e.
35	NOP-2	48-72	EBV-	-	-	-	N	-	Igλ	pc.
36	OH-2	4d	EBV-	záv., stim.	-	+	+	N	IgGκ	pl.fl.
37	OPM-2	30-60	EBV-	-	-	+	+	-	Igλ	PK

38	PCM6	40-60	EBV-	kons. záv.	-	+	N	-	IgG λ	PK
39	RPMI 8226	60-70	EBV-	-	-	+	+	+	IgG λ	PK
40	TH	24	EBV-	stim.	-	+	N	+	IgG κ	tumor
41	U-266	55	EBV-	mRNA+	-	+	+	+	IgE λ	PK
42	U-1996	48	EBV-	-	-	+	N	N	Ig κ	asc.
43	UTMC-2	48	EBV-	RT-PCR+	-	+	N	-	IgA κ	pl.e.
44	XG-1	N	EBV-	kons. záv., sekr.	-	+	+	-	IgA κ	PK
45	XG-2	N	EBV-	kons. záv.	-	+	+	+	IgG λ	pl.e.
46	XG-4	N	EBV-	kons. záv., sekr.	-	+	+	-	IgG κ	PK
47	XG-5	N	N	kons. záv.	-	+	+	-	Ig λ	PK
48	XG-6	N	EBV-	kons. záv.	-	(+)	+	-	IgG λ	PK
49	XG-7	N	EBV-	kons. záv., sekr.	-	+	+	-	IgA κ	PK
50	XG-8	N	N	záv., stim.	-	+	+	-	IgA λ	PK

1.3.3 Ustavení nové buněčné linie

Ustavení nové hematopoetické buněčné linie je obtížný proces s velmi nízkou úspěšností. Běžným postupem je založení suspenzní kultury z nádorových buněk. Většina pokusů však skončí nezdarem. Úspěšnost nelze dopředu předpovídat a je stále spíše náhodná. Pravděpodobnost vzniku buněčné linie lze posílit přidáváním růstových faktorů, které pomohou nádorovým buňkám překonat kritické období úpadku či zastavení proliferace. Příkladem jsou myelomové linie řady XG (Tab. 3), které byly ustaveny se 100% úspěšností díky přidávání IL-6 a GM-CSF do primárních kultur.⁶⁸

Existuje předpoklad, že vznik nové buněčné linie je pravděpodobnější ze vzorku buněk pacienta v relapsu než od pacienta, který byl právě diagnostikován. Drexler ve svém přehledu statisticky vyhodnotil status nemoci pacientů, ze kterých pocházely vzorky, které daly vzniknout hematopoetickým buněčným liniím. Z 554 zahrnutých linií, bylo ustaveno 54% z relapsu, 34% z diagnózy, 10% z blastického zvratu a 2% z období během terapie.⁵⁹

1.3.4 EBV+ B-lymfoblastoidní buněčné linie

EBV+ B-lymfoblastoidní buněčné linie (B-LCL) jsou takové, které jsou transformované virem Epstein-Barrové (virus EB; EBV). Virus EB je herpetický DNA virus, který patří mezi nejrozšířenější. V lidské populaci je jím nakaženo více než 90% dospělého obyvatelstva.⁶⁹ Primární infekce probíhá většinou bez příznaků, ojediněle může propuknout v infekční mononukleózu. EBV napadá *in vivo* 2 cílové skupiny buněk: B lymfocyty a buňky vrstevnatých epitelů. Na rozdíl od epiteliálních buněk se EBV v B lymfocytech

nereprodukuje nebo je latentní.⁷⁰ Ačkoliv si nakažení jedinci vytvoří jak humorální tak buněčnou imunitu proti EBV, přetrvává virus v těle po celý život zahrnut v paměťových B lymfocytech a je rizikovým faktorem pro vznik maligních onemocnění např. Burkittova lymfomu a především potransplantační lymfoproliferativní choroby (PTLD) a dalších.

Při kultivaci krevních buněk *in vitro*, kdy jsou buňky vystaveny určitému stresu vzhledem ke změněným podmínkám, je virus EB v B lymfocytech (je-li přítomen) často reaktivován. B lymfocyty se začnou neomezeně dělit a celá kultura přerůstá těmito lymfoblastoidními buňkami. Tento jev značně limituje vznik nových permanentních buněčných linií nejen mnohočetného myelomu. Jsou známy případy, především z minulosti, kdy v dobré víře nově ustavené permanentní buněčné linie z mnohočetného myelomu, chronické lymfocytární leukemie (CLL), plasmocelulární leukemie (PCL) a dalších zhoubných onemocnění krvinek byly pouze EBV+ B-LCL, a tedy nepocházely z populace maligních buněk původní nemoci.⁷¹

2 Cíle

Naším dlouhodobým cílem bylo ustavení nových permanentních linií z nádorových plasmatických buněk kostní dřeně odebrané pacientům s mnohočetným myelomem, které by posloužily jako nové modely a byly pokusným materiálem pro další studium etiopatogeneze, diagnostiky a léčby tohoto zhoubného onemocnění.

Primárním konkrétním úkolem byla kultivace nově příchozích buněčných vzorků od těchto pacientů, sledování chování buněk a jeho změn v takto založených dlouhodobých buněčných kulturách v podmínkách *ex vivo* s cílem ustavení permanentních linií nádorových buněk tohoto maligního onemocnění krvetvorby.

Vzhledem k úspěšnému rozvoji buněčné kultury jednoho vzorku kostní dřeně za vzniku permanentní buněčné linie se charakterizace této linie (ÚHKT-893) posléze stala hlavním cílem této diplomové práce.

3 Materiál a metody

3.1 Buněčné kultury

3.1.1 Buňky izolované z kostní dřeně pacientů

Vzorky kostní dřeně byly odebrány na 1. interní klinice hematonekologie VFN a 1.LF UK v Praze, se kterou spolupracujeme. Bezprostředně poté jsme je zpracovali v naší laboratoři. Vzorky byly číslovány v pořadí, v jakém jsme je obdrželi. Plasmatické buňky byly spolu s ostatními mononukleárními buňkami získány separací na hustotním gradientu Histopaque (hustota 1,077; Sigma-Aldrich) podle návodu. Vyseparované mononukleární buňky byly rozděleny na 2 stejné části, přeneseny do plastických nádob pro tkáňové kultury a kultivovány ve dvou různých médiích za níže uvedených podmínek. Zpravidla se jednalo o směs krevních elementů, kde se kromě plasmatických buněk vyskytovalo i mnoho dalších krvinek jak mononukleárních (lymfocyty, monocyty), tak i zbylých polymorfonukleárních buněk (granulocytů) často i erytrocytů. Vždy byly zakládány suspenzní kultury, avšak z přítomných prekurzorů se během několika dnů zpravidla vytvořila adherentní stromální vrstva. Počáteční koncentrace buněk byla různá v závislosti na množství počátečního materiálu v biopsii kostní dřeně, které se liší zpravidla v rozmezí 10^5 - 10^6 buněk/ml média.

3.1.2 Vzorek č. 893

Kostní dřeň č. 893 patřila 57leté ženě, které byl v roce 2008 diagnostikován mnohočetný myelom, klon IgGκ. Pacientka byla silnou kuřačkou a trpěla arteriální hypertenzí. Absolvovala 4 cykly chemoterapie (Velcade-Thalidomid-Dexona), dostala se do remise a úspěšně prodělala mobilizační chemoterapii (cyclofosamid a G-CSF), při které byly získány periferní krevní progenitorové buňky (PBPC; peripheral blood progenitor cell) pro autologní transplantaci kmenových buněk kostní dřeně. V únoru 2010 se pacientka dostala do relapsu. V této době byl naší laboratoří obdržen vzorek její kostní dřeně. Pacientka o měsíc později zemřela.

3.1.3 Buněčné linie

Během našich pokusů jsme používali linie:

- HL-60: myeloidní buněčná linie ustavená od pacientky s akutní myeloidní leukémií (AML) subtypu M2 (akutní myeloblastická leukemie s granulocytickou

maturací nesprávně označovaná jako promyelocytární leukemie M3). Kultura pochází od Dr. R. C. Gallo (NCI-NIH, Bethesda, USA).

- HEL: erytrocytární buněčná linie ustavená od pacienta s AML M6 (erytroleukémií). Byla získána od zakladatele této linie Dr. P. Martina (Seattle, USA).
- JURL-MK1: ustavená od pacientky s chronickou myeloidní leukémií (CML) v blastickém zvratu. Pochází ze sbírky buněčných linií DSMZ v Braunschweigu.
- MOLM-7: megakaryoblastoidní buněčná linie ustavená od pacienta s CML v blastickém zvratu (CD34+). Pochází od Dr. Y. Matsuo z Japonska.
- HeLa: ustavená od pacientky s adenokarcinomem děložního čípku. Byla získána z oddělení buněčné fyziologie ÚHKT.
- NALM-16: buněčná linie prekurzorových B buněk ustavená od pacientky s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL). Byla získána od Dr. J. Minowady (RPMI, Buffalo, New York, USA).
- CML-T1: buněčná linie nezralých T lymfocytů ustavená od pacienta s CML v akutní fázi. Pochází ze sbírky buněčných linií DSMZ v Braunschweigu.
- JURKAT: buněčná linie nezralých T lymfocytů ustavená od 14letého pacienta s ALL. Byla získána od Prof. V. Hořejšího (AVČR).

3.1.4 Kultivační médium

Buněčné kultury byly kultivovány v médiu RPMI 1640 (Biochrom) s 10% fetálním bovinním sérem (FBS; Biochrom), L-glutaminem (4 nM; Biochrom), uhličitarem sodným (0,22%; Biochrom), penicilinem (100 U/ml; Biochrom) a streptomycinem (100 µg/ml; Biochrom). Pro kultivaci vzorků kostní dřeně bylo médium pokusně doplňováno rekombinantním G-CSF (2000 U/ml; Roche).

Pro kultivaci buněčné linie ÚHKT-893, jejíž růst byl závislý na IL-6, bylo médium obohaceno o rekombinantní IL-6 (1 ng/ml; Biosource International).

3.1.5 Kultivace buněk

Buněčné kultury byly uchovávány v inkubátoru při 37⁰C v 5% humidifikované atmosféře CO₂ v plastických lahvičkách pro tkáňové kultury. Veškerá manipulace s buňkami byla prováděna asepticky v laminárním boxu. Mědium bylo měněno podle potřeby, min. 2x týdně, opatrným odsátím vrchní vrstvy starého média nebo stočením neusazených suspenzních buněk na centrifuze (1200 rpm/5 min) a následným odebráním média, které bylo posléze nahrazeno odpovídajícím množstvím média čerstvého.

Kultivace vzorků kostní dřeně probíhala paralelně jak v obyčejném médiu, tak v médiu obohaceném o G-CSF. Z každého vzorku pacienta jsme tak založili 2 primární buněčné kultury.

3.1.6 Zmrazování buněk

Buňky byly stočeny (1800rpm/5min). Peletu jsme resuspendovali v 90% FBS (Biochrom) + 10% DMSO (dimetylsulfoxid; Sigma). Buněčná suspenze byla přenesena do označených vychlazených kryozkumavek. Kryozkumavky byly ihned dány do mrazících kontejnerů (Nalgene), které byly uloženy do -80°C. Po zhruba 24 hodinách byly kryozkumavky přeneseny do tekutého dusíku (-196°C).

3.1.7 Vyloučení přítomnosti EBV

Vyloučení EBV jsme hodnotili zpravidla podle spolehlivých makroskopických znaků, kterými jsou výrazné okyselování média (projevuje se znatelným žloutnutím média již do 24 h) a velkými kompaktními koloniemi.

K potvrzení absence EBV u linie ÚHKT-893 jsme tyto buňky zaslali do Národní referenční laboratoře pro herpetické viry (Státní zdravotní ústav Praha) k Ing. Haně Hrbáčkové, kde byly pomocí PCR testované na přítomnost DNA EBV.

3.2 Morfologická charakterizace

Morfologie buněk primárních i přežívajících kultur byla určována z cytospinových preparátů (dále jen nátěrů). Jedná se o obdobu krevních roztěrových preparátů. Sterilně odebrané buňky z kultury (150 – 500 µl) byly přeneseny do speciální aparatury upevněné na podložní sklíčko. Následovala centrifugace na cytospinové centrifuze (80 rpm/10min). Vyhotovené preparáty byly předány k barvení Giemsou do morfologické laboratoře ÚHKT.

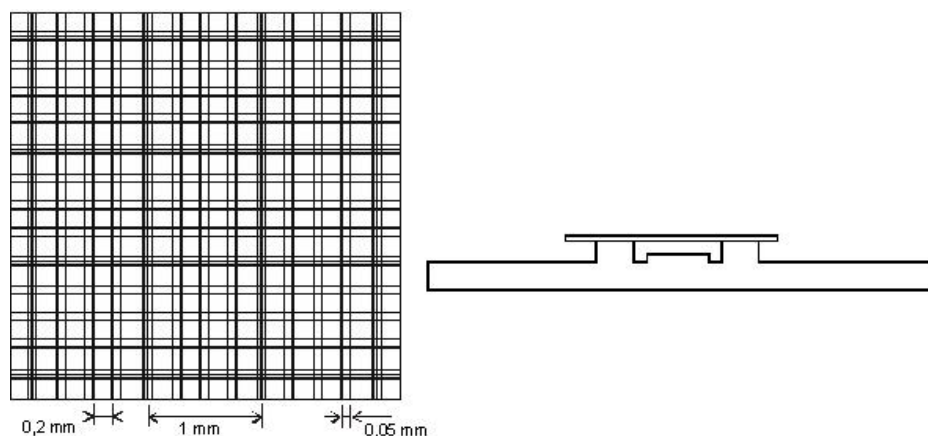
Vyhodnocení jsme provedli na optickém mikroskopu (Carl Zeiss) s použitím imerzního oleje (Carl Zeiss).

3.3 Počítání buněk a tvorba růstových křivek

Míra růstu nebo úbytku buněk byla sledována počítáním obarvených buněk trypanovou modří (0,4%; Sigma) v Bürkerově komůrce pod mikroskopem. Mrtvé buňky se barví modře, neboť je porušena integrita cytoplazmatické membrány. Podle získaných dat, byly sestaveny růstové křivky. Počty zahrnují pouze živé buňky. Při nasazení do kultury *ex vivo* byly u náhodně vybraných kultur sledovány počty buněk, abychom získali představu o chování buněk za daných podmínek. Počet buněk byl optimalizován na výsledný objem 10 ml pro porovnatelnost s počty získanými v různé době kultivace.

3.3.1 Počítání v Bürkerově komůrce

Bürkerova komůrka se skládá ze speciálně upraveného podložního skla, které má na vrchní straně vybroušené dvě identické mřížky, a speciálního krycího sklíčka, které se k podložnímu připevňuje dvěma svorkami. Mřížka je rozdělena do 9 velkých čtverců, které mají definované rozměry (Obr. 5). Hloubka komůrky je 0,1 mm. Z těchto údajů lze spočítat objem mezi sklíčkem podložním a krycím v prostoru nad mřížkou. Při počítání buněk je důležité postupovat systematicky tak, aby nebyly počítány některé buňky vícekrát. Platí to zejména o těch, které se vyskytují na hranici 2 čtverců. Množství vzorku musí vyplňovat celý prostor mezi plochou podložního sklíčka, kde je vybroušená mřížka, a krycím sklíčkem. Nesmí přetékat do postranních žlábků. V našich pokusech jsme standardně počítali buňky v 3-5 čtvercích v obou mřížkách.



Obr. 5. Bürkerova komůrka. Vlevo mřížka s devíti velkými čtverci; vpravo pohled z boku. Převzato z <http://www.wikiskripta.eu/>.

Vzorec pro výpočet buněk:

$$X = \left(\begin{array}{l} \text{průměrný počet} \\ \text{buněk v dané} \\ \text{ploše počítací} \\ \text{komůrky} \end{array} : \begin{array}{l} \text{objem} \\ \text{počítané} \\ \text{plochy} \end{array} \right) \times \begin{array}{l} \text{ředění} \\ \text{původního} \\ \text{roztoku} \end{array}$$

3.3.2 Sledování dynamiky růstu linie ÚHKT-893

Při vytváření růstové křivky nové linie ÚHKT-893 jsme využili kultivaci na 24jamkové destičce a v Erlenmayerově baňce.

a) Kultivace buněk v 24jamkové destičce

Do jednotlivých jamek byly nasazeny buňky do 2 ml média s IL-6 při koncentraci 50×10^3 buněk/ml. Buňky rostly kontinuálně ve všech jamkách. Každý den byla zrušena jedna jamka pro spočítání buněk. Vzhledem k částečnému vypařování média, ke kterému v inkubátoru dochází, byly výsledné počty optimalizovány na původní 2 ml.

b) Kultivace buněk v Erlenmayerově baňce

Buňky byly nasazeny do 10 ml média s IL-6 o koncentraci 10^5 buněk/ml. Během prvního měsíce kultivace bylo každý den odebráno 0,5 ml homogenní suspenze buněk na počítání v Bürkerově komůrce, poté již jen každý 2. nebo 3. den. Abychom mohli sledovat růst buněk po delší dobu, bylo během výměny média vyčerpané médium

nahrazeno stejným množstvím média čerstvého. Tím jsme zamezili naředění buněk a jeho vlivu na dynamiku růstu. Snížil-li se objem kultury pod 5 ml, doplnili jsme objem média opět na přibližně 10 ml, a to s buňkami v odpovídající koncentraci z jiné kultury ÚHKT-893.

3.4 Pokus o získávání linie ÚHKT-893 nezávislé na IL-6

3.4.1 Kultivace v médiu bez IL-6

Buňky byly 2x promyty v PBS (fosfátový pufr; Phosphate Buffered Saline) a byly nasazeny při hustotě přibližně $0,24 \times 10^6$ buněk /ml (pouze v prvním pokusu byla koncentrace buněk $0,1 \times 10^6$ /ml) ve 12 ml média bez IL-6 do Erlenmayerovy baňky. Pravidelně po 24 hodinách bylo odebráno 0,5 ml homogenní suspence. Buňky byly spočítány v Bürkerově komůrce. Vyčerpané médium bylo vyměněno za stejné množství čerstvého standardně po 3-4 dnech. Toto bylo provedeno v měsíčních intervalech celkem 4x, abychom zjistili, zda a do jaké míry se mění závislost linie ÚHKT-893 na IL-6.

3.4.2 Postupné snižování koncentrace IL-6 v médiu

Buňky byly stočeny (1800 rpm/5 min) a nasazeny v médiu s 1 ng/ml IL-6 do Erlenmayerovy baňky o hustotě $0,5 \times 10^6$ buněk/ml. Koncentrace IL-6 (na počátku 1 ng/ml) byla následně snižována po určitém počtu dní kultivace vždy v době, když byl zaznamenán progresivní růst v médiu se stávající koncentrací IL-6. Kontrola kondice buněk a jejich proliferace byla prováděna mikroskopicky před výměnou média počítáním buněk v Bürkerově komůrce. Počty buněk zde byly optimalizovány na objem 10 ml, aby byly porovnatelné s počty získanými ve vícedenních intervalech. Nebyl-li zaznamenán kvantitativní a kvalitativní pokrok, stávající koncentrace IL-6 byla ponechána. Výměna média byla prováděna po 2-4 dnech.

3.5 Průkaz imunoglobulinů

3.5.1 Průkaz sekrece imunoglobulinů

Sekrece imunoglobulinů buňkami včetně volných L řetězců do média byla stanovena pomocí nefelometrie v Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky, VFN a I.LF v Praze, u RNDr. Hany Benákové, MBA.

3.5.2 Proteinová analýza na hmotnostním spektrometru

Hmotnostní spektrometrie (MS; mass spectrometry) je nástrojem dynamicky se rozvíjejícího oboru proteomiky. Proteiny rozdělené na dvourozměrné (2-D; two-dimensional) elektroforéze, se měří na hmotnostním spektrometru a data analyzují pomocí speciálního softwaru.

2-D elektroforéza

Do zkumavky jsme odebrali přibližně 10^7 buněk a promyli v pufru 10 mM Tris (pH 7,4) s 250 mM sacharózou. Poté jsme buňky smíchali s 500 μ l vzorkového pufru (7 M močovina, 2 M thiomočovina, 4 % CHAPS, 40 mM Tris, 60 mM DTT [dithiothreitol] a 0,8 % Bio-lytes [Bio-Rad]). Buňky jsme sonikovali na ledu 6 x 15 s a nechali inkubovat při pokojové teplotě 25 min. Buňky jsme stočili (1200 rpm/10 min) a supernatant přendali do čisté mikrozkušavky. K odstranění solí a lipidů jsme využili 2-D Clean-Up Kit (Amersham Bioscience) a postupovali podle návodu tohoto kitu. Výslednou peletu jsme resuspendovali v 350 μ l rehydratačního roztoku (7 M močovina, 2 M thiomočovina, 4 % CHAPS, 40 mM DTT a 0,8 % Bio-lytes). Koncentraci proteinů jsme určili metodou Bradfordové. 800 μ g proteinu jsme naředili rehydratačním roztokem na výsledný objem 350 μ l. Přidali jsme 1,4 μ l bromfenolové modři (0,5%; Merck). Strip pro 2-D elektroforézu (ReadyStrip IPG Strips, Bio-Rad) jsme rehydratovali podle návodu pro strip přes noc. Druhý den byly podle téhož návodu proteiny rozděleny v prvním směru pomocí izoelektrické fokusace. Následně jsme strip vyndali a ekvilibrovali 15 min v ekvilibračním pufru (6 M močovina, 20 % glycerol, 10 % SDS [dodecylsírán sodný; sodium dodecyl sulphate], 1,5 M Tris, pH 8,8) s přídavkem 0,26 M DTT a následně 15 min v ekvilibračním pufru s přídavkem 0,27 M jodacetamidu. Proteiny byly rozděleny ve druhém směru pomocí klasické SDS-elektroforézy na 12 % akrylamidovém gelu. Výsledný gel jsme opláchli v destilované vodě a obarvili v roztoku SimplyBlueTM SafeStain podle návodu (Invitrogen).

Příprava vzorku na MS

Vybraný proteinový spot na 2-D elektroforéze jsme vyřízli a rozkrájeli na kostičky o hraně 1 mm. Převrstvili jsme je 100 μ l 50mM roztoku NH_4HCO_3 v 50% acetonitrilu (ACN) s 50 mM DTT. Vzorky jsme inkubovali 5 min v ultrazvukové čistící lázni. Po dalších 15 min jsme odstranili roztok a ke gelu přidali 100 μ l 50 mM NH_4HCO_3 v 50% ACN s 50 mM jodacetamidem. Směs jsme sonikovali 5 min. Po 25 min byl roztok nahrazen 100 μ l NH_4HCO_3 v 50% ACN s 50 mM DTT. Směs jsme sonikovali 5 min. Roztok jsme nahradili

100 μ l vody pro HPLC (vysokotlaká kapalná chromatografie; high pressure liquid chromatography) a vzorek sonikovali 5 min. Voda byla nahrazena 100 μ l ACN a vzorek opět sonikován 5 min. ACN byl odstraněn a zkumavky jsme nechali otevřené, aby se přebytek ACN mohl vypařit. Ke vzorku jsme přidali 5 ng trypsinu (Promega) v 10 μ l 50 mM NH_4HCO_3 . Vzorek jsme nechali inkubovat přes noc při 37°C. Druhý den jsme přidali trifluoroctovou kyselinu (TFA) a ACN do konečné koncentrace 1% TFA a 30% ACN. Vzorek jsme sonikovali 10 min. Nanesli jsme alikvot 0,5 μ l na terčík pro MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization). Odpařené kapky byly převrstveny 0,5 μ l roztoku α -kyanohydroxyskořicové kyseliny (2 mg/ml v 80% ACN) a nechány odpařit. Vzorky byly změřeny a výsledky vygenerovány Mgr. Petrem Jedelským v laboratoři hmotnostní spektrometrie na Přírodovědecké fakultě UK v Praze.

3.6 Průkaz povrchových antigenů imunofluorescenčním značením

K identifikaci povrchových antigenů bylo využito imunofluorescenčního značení. Jedná se o dnes běžně používanou metodu v molekulární biologii, která využívá monoklonálních i polyklonálních protilátek a na ně navázaných fluorescenčních značek (fluorochromů).

Na jeden vzorek bylo odebráno $0,5 \times 10^6$ buněk. Buňky byly stočeny (2000 rpm/5 min), 2x promyty v PBS a nakonec jemně resuspendovány ve zbytku (asi 50 μ l) PBS. K této buněčné suspenzi bylo přidáno určité množství neznačené nebo značené primární protilátky (Tab. 4). Inkubace buněk s protilátkou probíhala 15-20 min při 4°C za občasného promíchání suspenze. Poté byly buňky s navázanou protilátkou 2x promyty v PBS a opět resuspendovány v jeho zbytku. K suspenzi buněk, které byly inkubované s primární neznačenou protilátkou, byly přidány 2 μ l sekundární protilátky značené fluorochromem (v našem případě fykoerytrinem (PE; phycoerytrin). Používali jsme králičí nebo kozí sekundární protilátky (Dako) proti myším protilátkám izotypu IgG a IgM. Inkubace probíhala stejně jako při značení primární protilátkou a vzorky byly nakonec opět promyty 2x v PBS.

K ověření funkčnosti použitých protilátek proti danému antigenu byly zpracovány pozitivní a negativní kontroly z buněčných linií, u kterých je známé, že nesou daný antigen na povrchu buňky. Ke každé linii (testované i kontrolní) byly navíc připraveny 2 negativní kontroly: neznačené buňky a buňky, ke kterým byla přidána pouze sekundární protilátka. Abychom určili co možná největší spektrum povrchových antigenů, změřili jsme všechny antigeny, pro které jsme měli protilátky a příslušné kontroly (Tab. 4).

Tab. 4. Přehled použitých primárních protilátek proti povrchovým antigenům. Protilátky jsou myší – anti lidské. N – není k dispozici.

protilátka anti-	výrobce	množství protilátky	pozitivní kontrola	negativní kontrola
CD1	Coulter Clone	10 µl	JURKAT	HL-60
CD3	ze supernatantu	30 µl	JURKAT	HL-60
CD4	Becton Dickinson	40 µl	HL-60	N
CD5	ze supernatantu	20 µl	JURKAT	HL-60
CD9	Hybritech	10 µl	HL-60	N
CD10	Orthomune	5 µl	NALM-16	HL-60
CD13-PE	Bioscience	5 µl	HL-60	N
CD15	Becton Dickinson	10 µl	HL-60	MOLM-7
CD19	Coulter Clone	5, 10 µl	NALM-16	HL-60
CD20	Coulter Clone	10 µl	HEL	HL-60
CD21	Coulter Clone	10 µl	HEL	N
CD24	Orthodiagnostic	20 µl	NALM-16	JURL-MK1
CD33-PE	eBioscience	5 µl	HL-60	N
CD34	Diaclone	10 µl	MOLM-7	HL-60
CD38-PE	eBioscience	5 µl	HL-60	HEL
CD44	Exbio	1 µl	HL-60	JURL-MK1
CD45-PE	Exbio	5 µl	HL-60	HeLa
CD56-PE	Beckman Coulter	5 µl	N	JURL-MK1
CDw65	Immunotech	5 µl	HL-60	N
CD117	Immunotech	20 µl	HEL	HL-60
CD138-PE	Immunotech	5 µl	N	HL-60, MOLM-7, NALM-16, JURKAT, CML-T1
HLA-DR	Immunotech	5 µl	NALM-16	HL-60

Kromě uvedených kontrol se k vyloučení nespecifických vazeb při imunofluorescenci používají ještě izotypové kontroly. Jedná se o protilátky stejného izotypu původem ze stejného živočišného druhu. Používají se ve stejné koncentraci jako původní primární protilátka. Svým paratopem se však neváží na žádnou strukturu daných buněk. Používají se komerční izotypové kontroly s fiktivním paratopem použitelné na jakýchkoli buňkách nebo se využívají takové antigeny, u kterých je prokázáno, že se na zkoumaných buňkách nevyskytují.

Značené vzorky byly pozorovány na fluorescenčním mikroskopu a měřeny na průtokovém cytometru. Cytometrická data byla analyzována v aplikaci WinMDI 2.8, která je volně dostupná na internetu.

Při vyhodnocování dat získaných na průtokovém cytometru jsme si nejdříve zobrazili populaci všech naměřených buněk (50 tisíc) mezi parametry FS (forward scatter) a SS (side scatter), kde FS udává velikost buněk a SS jejich granularitu. U negativních kontrolních vzorků (neznačené nebo jen se sekundární protilátkou) každé linie jsme vytyčili 2 regiony v zobrazení dot plot. Do prvního jsme vybrali živou populaci buněk a při následném zpracování dat jsme pracovali pouze s touto živou populací. Druhým regionem jsme vyznačili oblast grafu mezi parametry SS x intenzita fluorescence (PE), kam už buňky negativních kontrolních vzorků liní svou intenzitou fluorescence nezasahovali (s tolerancí zhruba do 5 %). Druhý region nám takto označoval pozitivní populaci živých buněk. Graf 10 příkladně znázorňuje, jak jsme postupovali při vytyčování regionů. U značených vzorků jsme ve druhém regionu zjišťovali procento pozitivních buněk, od kterého jsme odečetli malé procento (0-5%) buněk, které u negativních kontrolních vzorků zasahovali do pozitivní oblasti. Značené vzorky jsme následně zobrazovali v histogramech. Pro názornost jsme je prokládali negativními kontrolami – při použití sekundární protilátky kontrolou se sekundární protilátkou, při použití primární protilátky konjugované s PE neznačenou kontrolou. Odečetli jsme také průměrnou intenzitu pozitivivity v podobě geometrického průměru (hodnota GMean).

Část výsledků byla zpracována v rutinní laboratoři průtokové cytometrie na ÚHKT u pana MUDr. Iuri Marina, CSc. Zde byly testovány znaky CD3, CD4, CD8, DC19, CD28, CD38, CD45, CD56, CD117, CD138, κ a λ .

Změřili jsme také znaky CD138 a CD45 na buňkách ÚHKT-893, které byly dlouhodobě kultivované v médiu, ve kterém jsme postupně snižovali koncentraci IL-6. Buňky byly odebrány ve fázi, kdy koncentrace IL-6 činila 0,025 ng/ml. 2 dny před měřením byly (omylem) ponechány v médiu s koncentrací 0,2 ng/ml IL-6. Další postup – imunoznačení – byl shodný s výše popsáním.

3.7 Měření senescence

Míra senescence byla měřena duplikátně 4x za sebou v měsíčních intervalech od 11. měsíce od založení kultury 893. K jejímu stanovení byl používán komerční kit, který prokáže β -galaktosidázovou aktivitu charakteristickou pro senescentní buňky při pH 6 (Cell Signaling

Technology). Buňky na analýzu jsme odebírali přímo z kultur. Jako kontrolní buňky jsme zvolili linii HL-60. Zpracování vzorků probíhalo podle návodu daného kitu. Podíl senescentních buněk byl mikroskopicky odečten v Bürkerově komůrce. Nutno poznamenat, že odečtení výsledků podléhá částečně subjektivnímu rozhodnutí, zda je určitá buňka dostatečně obarvena, aby byla hodnocena jako senescentní.

3.8 Použité přístroje

Inkubátor FUNCTION line (Heraeus)

Laminární box HERA safe (Heraeus)

Mikroskopy:

- Amplival Carl Zeiss Jena
- Nikon, Japonsko
- fluorescenční mikroskop Carl Zeiss Jena Lumar
- invertovaný mikroskop Olympus IMT-2
- invertovaný mikroskop Meopta IDM

Centrifugy

- Cytospin 2 (Shandon)
- Rotofix 32 (Hettich)

Fotoaparát Olympus C-3030 ZOOM

Průtokový cytometr Coulter Epics XL (Beckman Coulter)

4 Výsledky

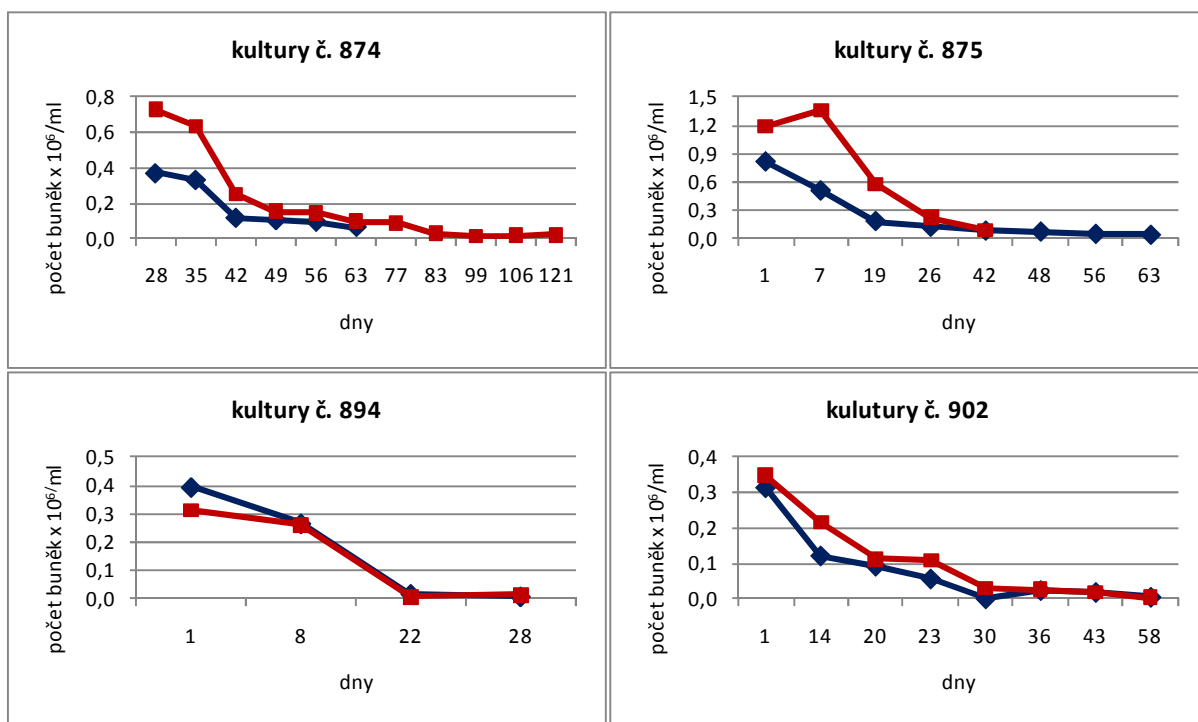
4.1 Kultivace buněk kostní dřeně

Během období téměř deseti měsíců byly kultivovány buňky kostní dřeně od 49 pacientů s MM. Průměrná doba kultivace byla 55 dnů. V průběhu tohoto časového úseku bylo ustanoveno 7 EBV+ B-LCL a jedna myelomová linie ÚHKT-893 (Tab. 5). Důvodem zániku buněčných kultur bylo nejčastěji kritické snížení počtu buněk (Graf 1A-D), kdy bylo rozhodnuto, že by další kultivace již nevedla k zlepšení jejich stavu a proliferaci, dále rozvinutí EBV+ B-lymfoblastoidních klonů nebo kontaminace kvasinkami, ke které došlo ve dvou případech.

Tab. 5. Přehled primárních myelomových kultur. Uvedena jsou čísla pacientů, pod kterým byli vedeni v naší laboratoři, jejich diagnóza, přibližný odhad počtu plasmatických buněk v nátěru kostní dřeně při založení kultury, délka kultivace primárních kultur v médiu s G-CSF a bez něj a způsob zániku kultury, pokud byl jiný než celkový úpadek kultury. EBV – rozvoj EBV+ B-LCL, MGUS – monoklonální gamapatie nejasného významu, MM – mnohočetný myelom, kvasinky – kontaminace kultury, k vyl. – k vyloučení, převzato – kultura převzata kolegyní k další kultivaci, spojeno – buňky přeneseny do druhé (lépe prosperující) z dvojice kultur s/bez G-CSF, ssp. – suspektní, vs. – vstupní staging.

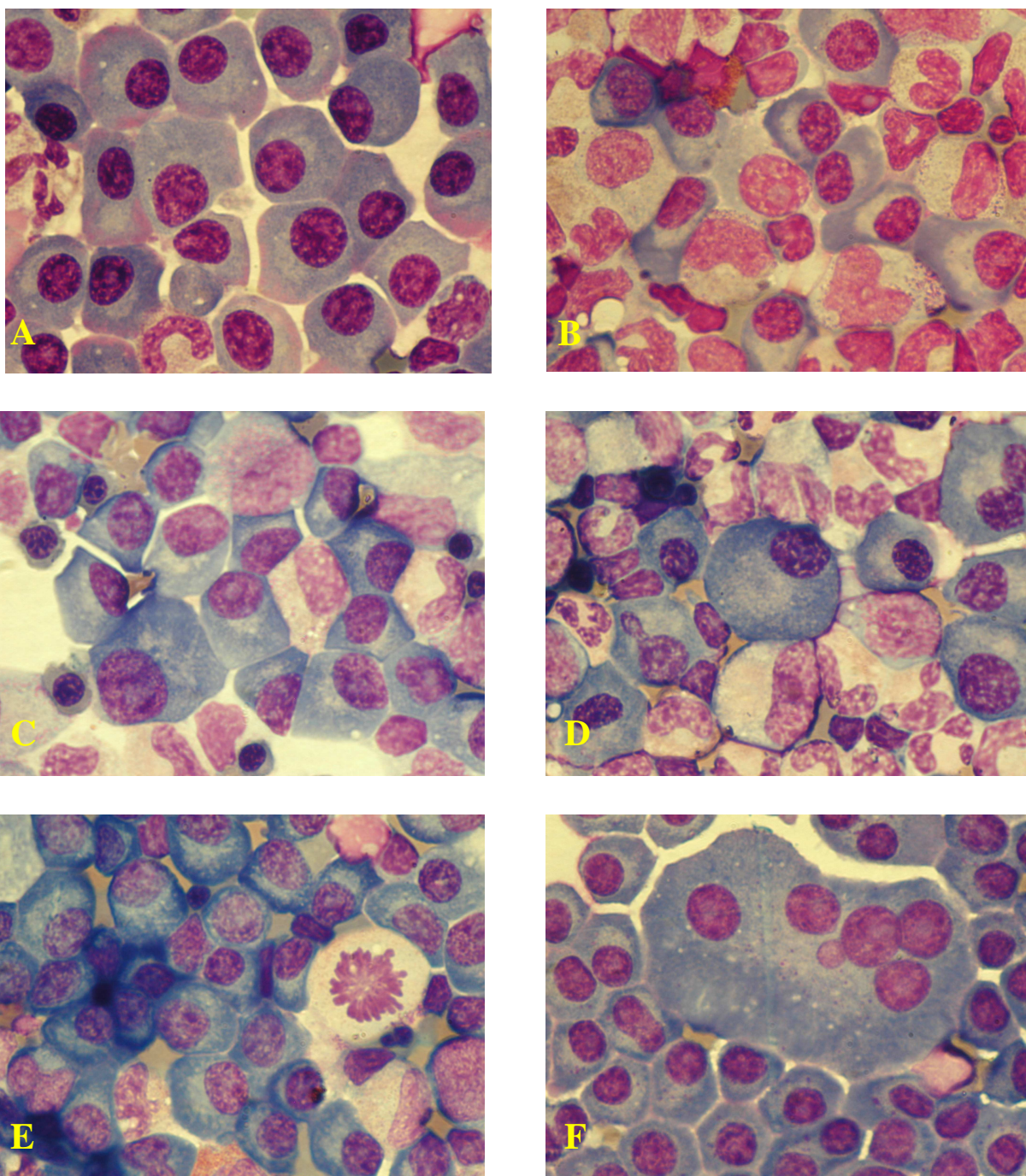
pacient č.	diagnóza	% plasm. buněk	médiu bez G-CSF		médiu s G-CSF	
			dnů kultivace	zánik	dnů kultivace	zánik
849	ssp. MM	10	40	EBV -spojeno s kulturou v médiu s G-CSF	40	EBV -spojeno s kulturou v médiu bez G-CSF
850	MM, vs.	90	101	EBV	53	spojeno
851	MM, vs.	20-30	51		51	
853	MM	50	167		112	spojeno
855	MM, vs.	50	103		84	spojeno
856	MM, vs.	20-30	56		35	spojeno
859	MM, vs.	40-60	89		144	
862	MGUS	20	62		62	
863	MM	20-30	41		41	
865	MM, vs.	60-70	20	spojeno	35	
866	ssp. MM	40	69		69	
867	MM	80	164		216	
870	ssp. MM	10-30	48		54	
873	MM, vs.	20	56	spojeno	112	
874	ssp. MM	20-30	76	kvasinky	188	
875	MM-relaps	80	95		47	spojeno

877	MM	70	89	EBV	60	
882	MM, vs.	60	46		81	
885	MGUS k vyl. MM	10	46		46	
887	MM	40-50	39		39	
888	ssp. MM	5	20		20	
889	MM-relaps	2-5	32		32	
893	MM-relaps	30-40	21		ustavení ÚHKT-893	-
894	MM-relaps	60-70	42		42	
896	MGUS	40	42		42	
897	MM-relaps	50-60	79		104	
902	progrese	70-80	73		66	
904	MM, vs.	50	65		57	EBV
908	MM, vs.	90	41		57	
912	MM, vs.	10-30	42	EBV -spojeno s kulturou v médiu s G-CSF	42	EBV -spojeno s kulturou v médiu bez G-CSF
914	MGUS k vyl. MM	5	13		15	
915	ssp. MM	2	16		16	
916	MGUS	10-20	119		119	
917	MM, vs.	5-10	32		32	
918	ssp. MM	30-50	30		30	
919	MM-relaps	2-5	29		36	
921	MGUS	5	22		36	
922	ssp. MM	20	22		57	
923	MM, vs.	20	29		57	
925	MM po asct.	5-10	18		35	
929	MM, vs.	10-30	83		83	
930	MM-relaps	70-80	18		18	
931	ssp. MM	5-10	32		32	
932	ssp. MM	99	22	spojeno	71	převzato
933	MGUS	2-5	31	EBV -spojeno s kulturou v médiu s G-CSF	31	EBV -spojeno s kulturou v médiu bez G-CSF
934	ssp. MM	5-10	34		24	kvasinky
935	ssp. MM	10	14		6	spojeno
936	MM, vs.	40-50	40	EBV -spojeno s kulturou v médiu s G-CSF	40	EBV -spojeno s kulturou v médiu bez G-CSF
938	MM, vs	20	35		35	



Graf 1A-D. Růstové křivky vybraných primárních kultur pacientů. Grafy vykreslují úbytek buněk v primárních kulturách založených ze vzorků kostní dřeně. Dny jsou číslovány od začátku kultivace. Modrá křivka znázorňuje buňky kultivované v médiu bez G-CSF, červená buňky v médiu s G-CSF.

Na Obr. 6A-F jsou vyfotografované vybrané nátěry z kostní dřeně ze dne odběru (srov. s Tab. 5). Naprosto neuvěřitelný pohled se nám naskytl při pozorování nátěru z kostní dřeně pacienta 932 (Obr. 6F). Až na ojedinělé výjimky byly všechny buňky plasmatické, mnohé z nich multinukleární, které tvořili prazvláštní útvary. Uvážíme-li, že normální kostní dřeň obsahuje 1-2% plasmatických buněk, je s podivem, k jakým stavům může při nemoci dojít.

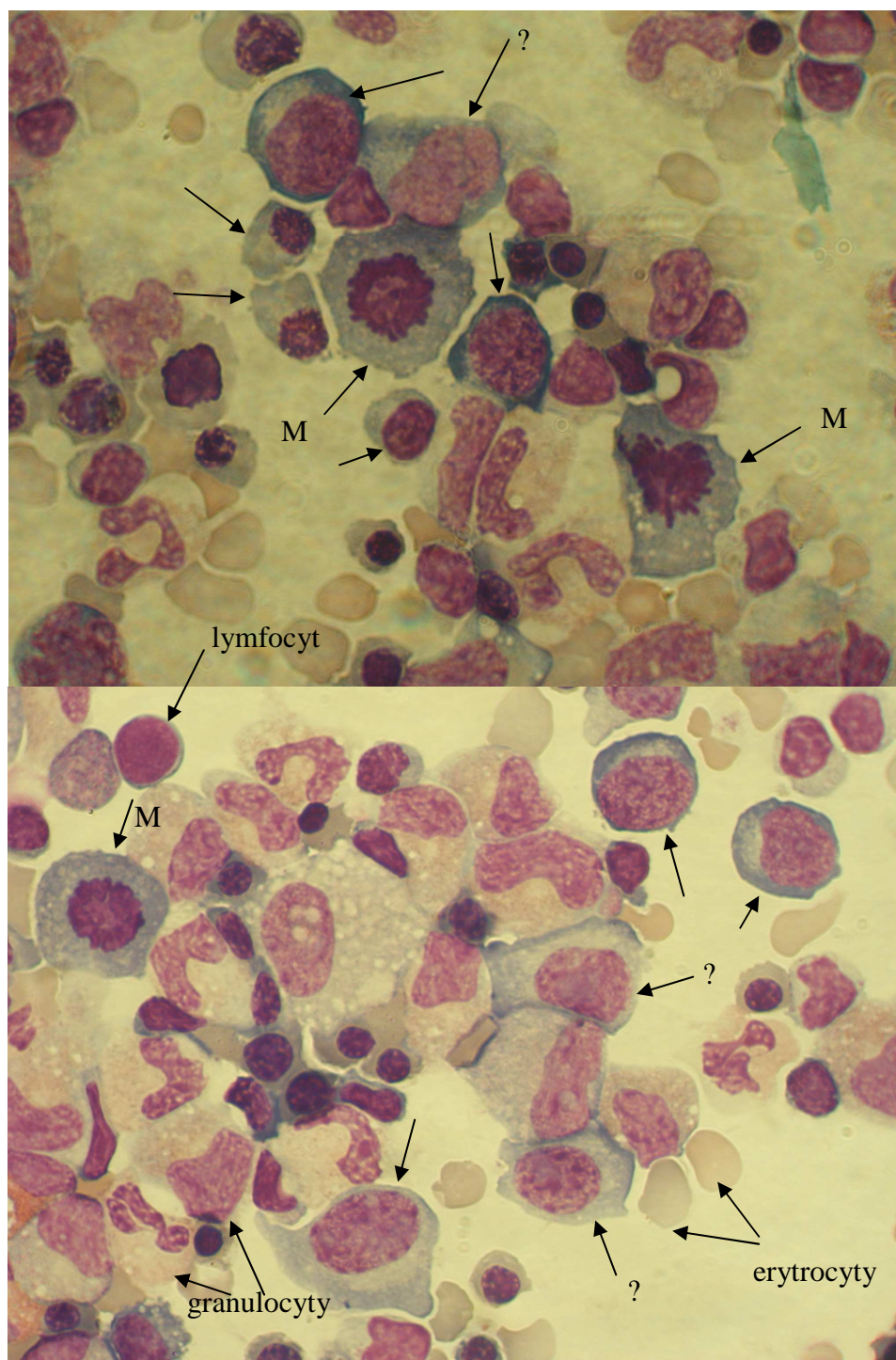


Obr. 6A-F. Nátěry kostní dřeně pacientů s myelomem v den založení kultury. Pacienti č. A: 850, B: 855, C: 894, D: 902, E: 904, F: 932. Buňky s modrou cytoplazmou, světlým „haló“ v blízkosti fialového jádra jsou plasmatické buňky. Zvětšení 10 x 100 x 1,5.

4.2 Ustavení myelomové linie ÚHKT-893

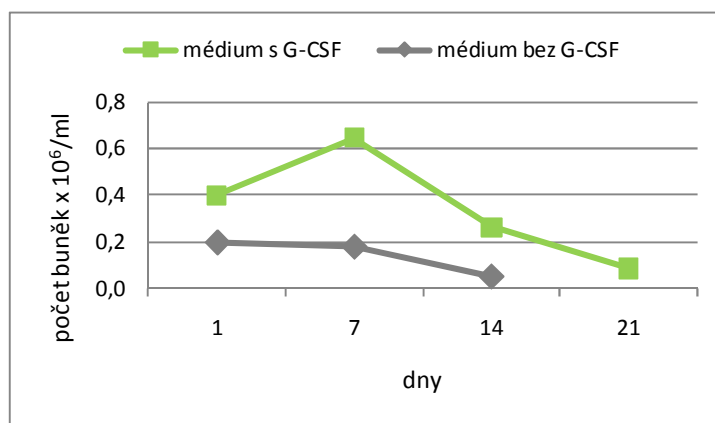
Buněčné kultury linie ÚHKT-893 jsme založili 16. 2. 2010 v normálním médiu a v médiu s G-CSF. Počet plasmatických buněk v prvním cytopinovém preparátu (Obr. 7) jsme určili zhruba na 30-40%. Sedmý den kultivace obsahovaly kultury stále množství

erytrocytů a nebyly pozorovány žádné stromální buňky. Z nátěrů bylo patrné, že značně převládají buňky myeloidní řady. Počet plasmatických buněk se snížil na zhruba 10%.



Obr. 7. Nátěr z kostní dřeně pacientky 893 v den odběru. Buňky s modrou cytoplazmou a světlým „haló“ v blízkosti fialového jádra jsou plasmatické buňky (označené šipkou bez popisku). Otazníkem jsou označené buňky, u kterých je nasnadě pochybnost, zda jde o granulocyty. Mitotické buňky, které jsou zde jasně patrné (označené písmenem M), jsou pravděpodobně plasmatické buňky. Jejich mitózy jsou v nátěrech kostní dřeně vzácné a běžně se téměř nevyskytují. Zvětšení 10 x 100.

Po 13 dnech kultivace jsme poprvé zaznamenali první stromální buňky adherované na dně lahvičky. Celkové množství buněk v lahvičkách se pomalu snižovalo (Graf 2). 20. den kultivace jsme podle celkového vzezření kultury v normálním médiu usoudili, že její další kultivace již nemá smysl. Buňky byly v porovnání s normálními životnými kulturami malé a z velké části rozpadlé. V médiu s G-CSF se drželo relativně přiměřené množství buněk (pokryv dna lahvičky cca 75%), které se lišily ve své velikosti. Část buněk měla tvar různě protáhlý. Slabá stromální vrstva byla vytvořena. Erytrocyty již v kultuře nebyly.

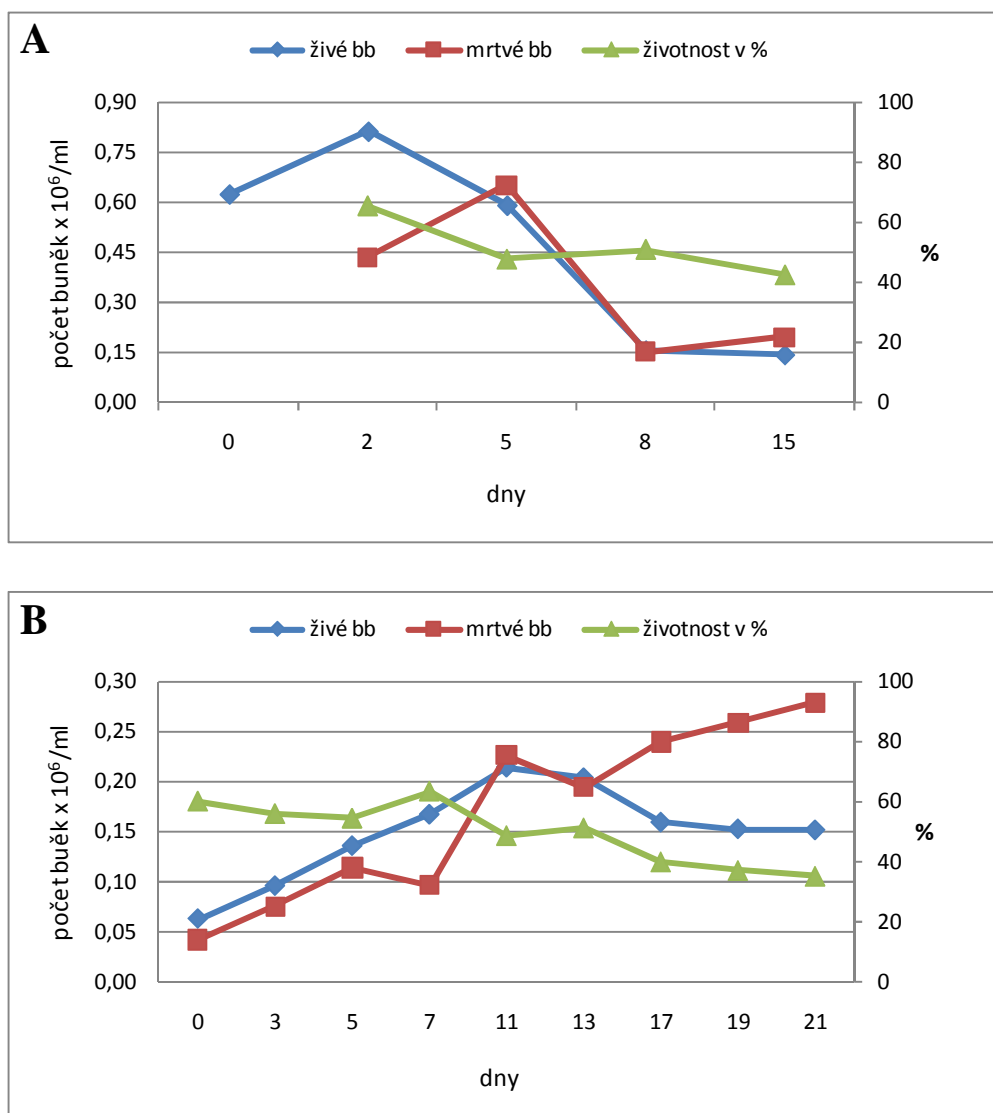


Graf 2. První týdny kultivace buněk z kostní dřeně pacienta č. 893.

Po 34 dnech v kultuře se profil buněk změnil tak, že byly co do velikosti více homogenní a částečně tvořily malé kolonie o několika málo buňkách. Protáhlé buňky téměř zcela vymizely. Stromální vrstva byla vytvořena bez zřetelné progresse. Při kontrole kultury 41. den jsme již nabyli dojmu, že buňky proliferují. To mohlo znamenat vznik buď nové myelomové linie nebo další EBV+ B-LCL. Kultura byla rozdělena do 2 kultivačních lahviček s G-CSF. O den později se profil buněk nijak zvlášť neměnil od kultury popsané 34. den. 43. den kultivace již bylo jasné, že buňky rostou. Navíc kultura nejevila znaky, že by se jednalo o EBV+ B-LCL (žádné výrazné žloutnutí média ze dne na den, ani vznik typických mohutných buněčných shluků). Označili jsme tedy tyto buňky pracovně za nově vznikající myelomovou linii ÚHKT-893. Absenci EBV jsme u linie později potvrdili také na základě výsledků z Národní referenční laboratoře pro herpetické viry.

V následujících týdnech byly z původních dvou lahviček, ve kterých se vytvořila vrstva stromálních buněk, zakládány nové kultury ÚHKT-893 v plastických lahvičkách a ve skleněných Erlenmayerových baňkách s G-CSF i bez něho. Zároveň jsme průběžně část buněk zamrazovali a ukládali do tekutého dusíku. V nových kulturách už nedošlo k vytvoření stromálních vrstev, neboť prekurzory stromálních buněk byly již evidentně vyčerpané. Buňky v Erlenmayerových baňkách prosperovaly podle odhadu o něco lépe (data nejsou uvedena),

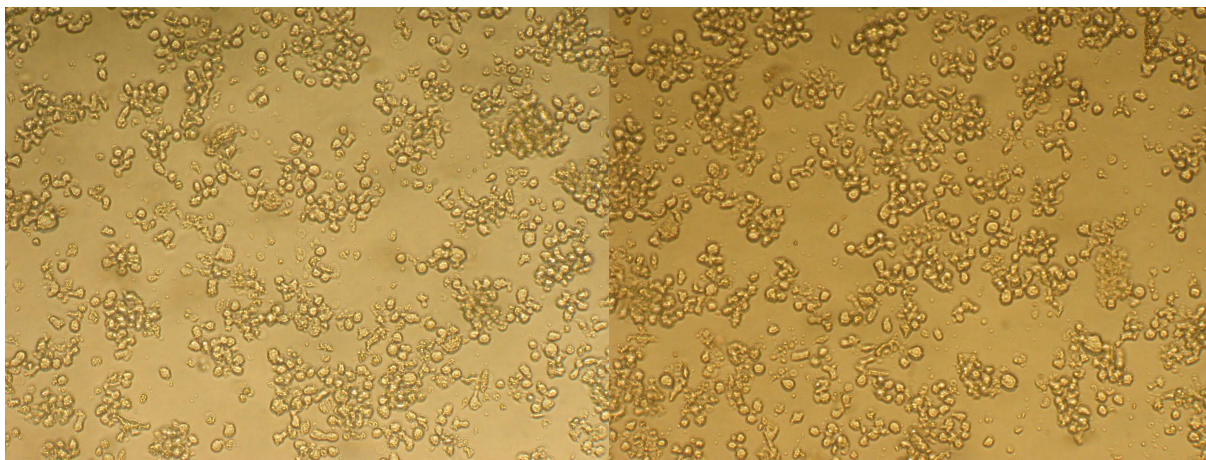
ale celkově jsme v nově založených kulturách zaznamenávali úpadek a konečný zánik (Graf 3A-B). Vzhledem k tomuto stavu a proto, že nemalá část myelomových linií, které byly doposud ustanoveny, jsou závislé na IL-6, obohatili jsme o tento cytokin některé z kultur ÚHKT-893 v různých koncentracích. Kultury s IL-6 o koncentraci 1 ng/ml pomalu rostly, kdežto buňky v kulturách s koncentrací IL-6 nižší než 1 ng/ml se rozpadaly nezávisle na přítomnosti G-CSF. IL-6 jsme rozpoznali jako růstový faktor, na kterém se staly buňky ÚHKT-893 závislé.



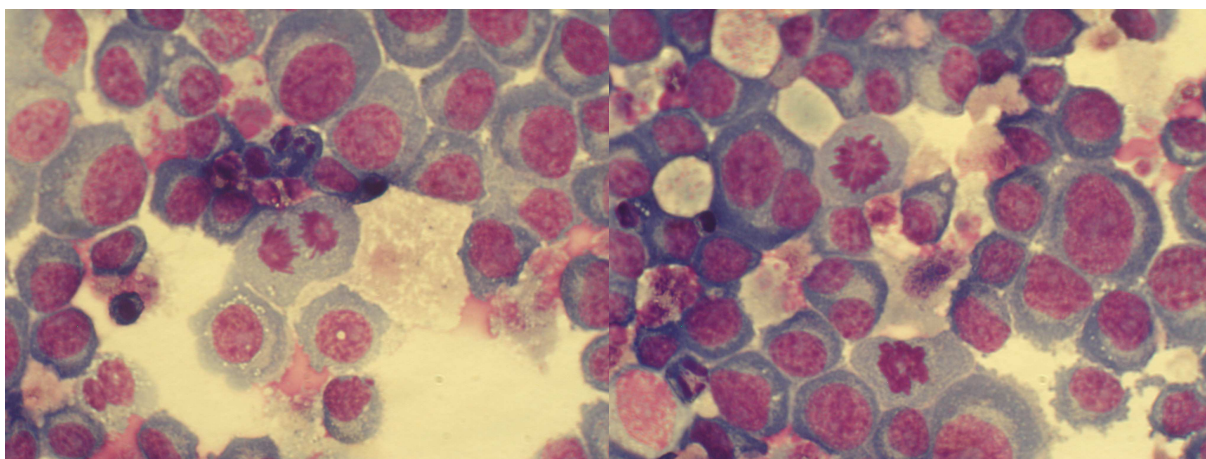
Graf 3A-B. Původní kultivace ÚHKT-893 bez IL-6 a stromální vrstvy. Data byla získána z nově zakládaných kultur do plastických lahvíček v období 3. (A) a 4. (B) měsíce po začátku kultivace buněk 893. V těchto nových lahvíčkách se již nevytvořila vrstva stromálních buněk. Je patrné, že životnost buněk bez růstového faktoru IL-6 a podpůrné stromální vrstvy od začátku kolísala těsně nad hranicí 50%. Počet mrtvých buněk se však zvyšoval a nakonec došlo k zániku kultur. Nicméně je zřetelné, že úpadek ve 4. měsíci nastal až po prvním týdnu kultivace, kdy kultura prospívala. Ovšem i v tomto krátkém období růstu se životnost pohybovala těsně nad hranicí 50%.

4.3 Morfologie buněk ÚHKT-893

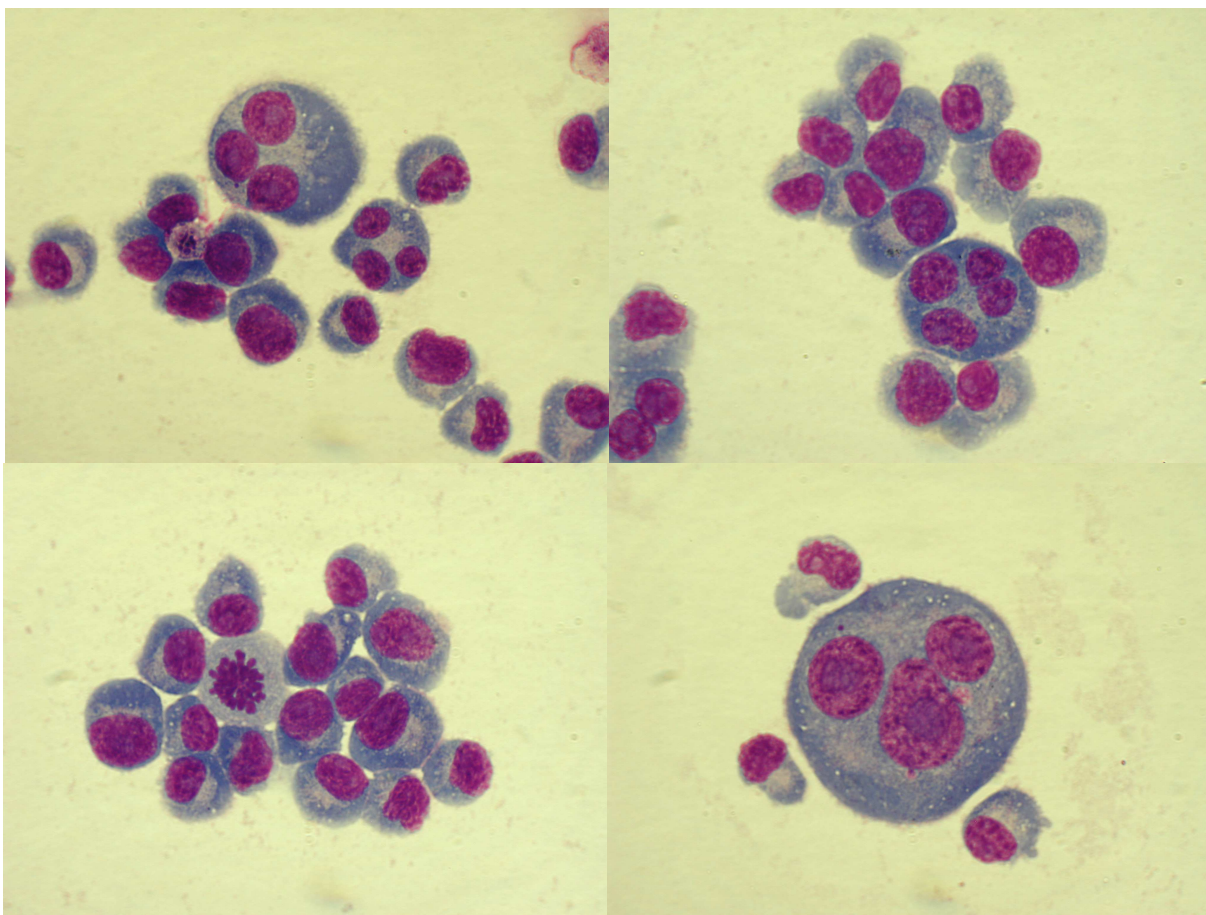
Morfologické vlastnosti buněk jsme sledovali mikroskopicky a na nátěrech obarvených Giemsou (Obr. 8-10).



Obr. 8. Buňky ÚHKT-893 v kultuře po 4 měsících. Zvětšení 10 x 20.



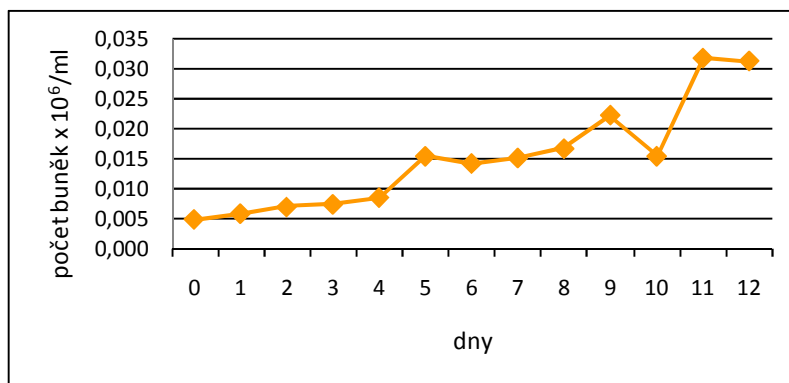
Obr. 9. Buňky ÚHKT-893 po 5 měsících v kultuře. Částečně vyselektované myelomové buňky naší linie. Je zde patrná mitotická aktivita. Zvětšení 10 x 100.



Obr. 10. Buňky ÚHKT-893 v 11. měsíci kultivace. Čistě vyselektované myelomové buňky. Pozorujeme jasné „haló“ v blízkosti jádra, mitózu i multinukleární buňky. Zvětšení 10 x 100.

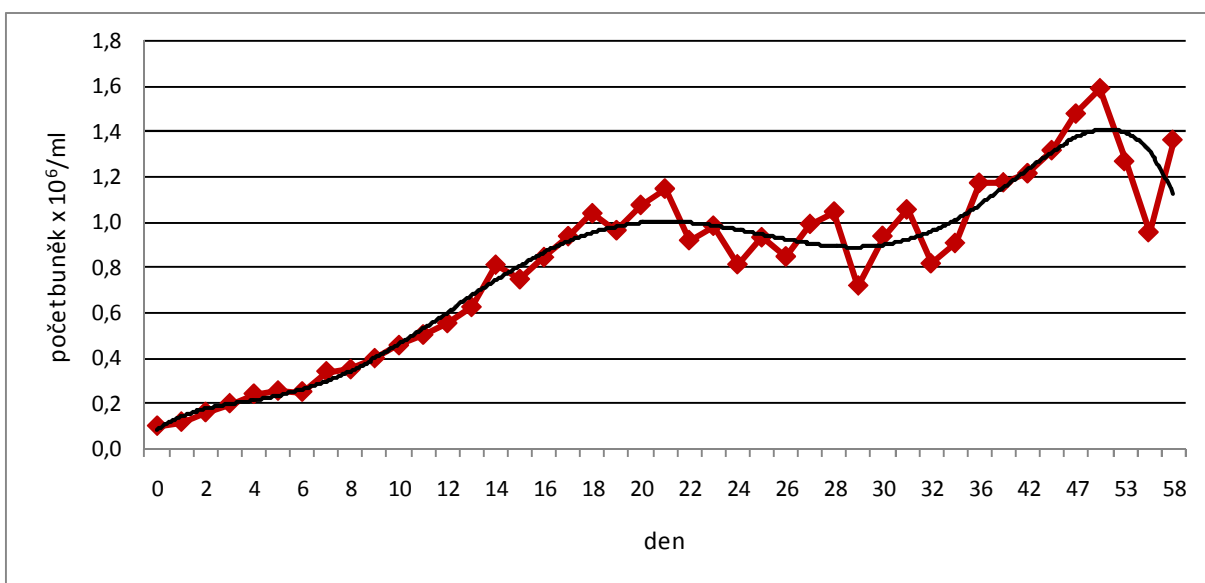
4.4 Dynamika růstu ÚHKT-893

Po úvodních obtížích s kultivací buněk popsaných v předchozí kapitole 4.2 linie ÚHKT-893 s IL-6 prosperovala nezávisle na stromálních buňkách. Při kultivaci buněk v jamkách na 24jamkové destičce, která trvala 12 dní, byla doba zdvojení počtu buněk spočítána na 4 dny.



Graf 4. Růstová křivka ÚHKT-893 při kultivaci v 24jamkové destičce po roce od nasazení buněk pacienta 893 do kultury.

Při kultivaci v Erlenmayerově baňce s počáteční koncentrací buněk $0,1 \times 10^6/\text{ml}$ se kultura zdvojnásobila každých 3-5 dnů. Na rozdíl tedy od všeobecně předpokládaného exponenciálního růstu vykazovala kultura růst spíše lineární (Graf 5). Po dosažení hustoty $0,8 \times 10^6$ buněk/ml, množství buněk kolísalo mezi hodnotami $0,8-1,148 \times 10^6$ buněk/ml a jen jedenkrát kleslo pod hranici $0,8 \times 10^6$ buněk/ml. Buňky byly takto sledovány do 58. dne, kdy jsme se rozhodli měření ukončit, protože jsme usoudili, že jsme již při měření přesáhli max. hustotu buněk s následným zřetelným poklesem růstové fáze kultury a že pokračování by bylo spíše artefaktem, vzhledem k narůstajícímu množství mrtvých buněk při dlouhodobé kultivaci bez pasážování.

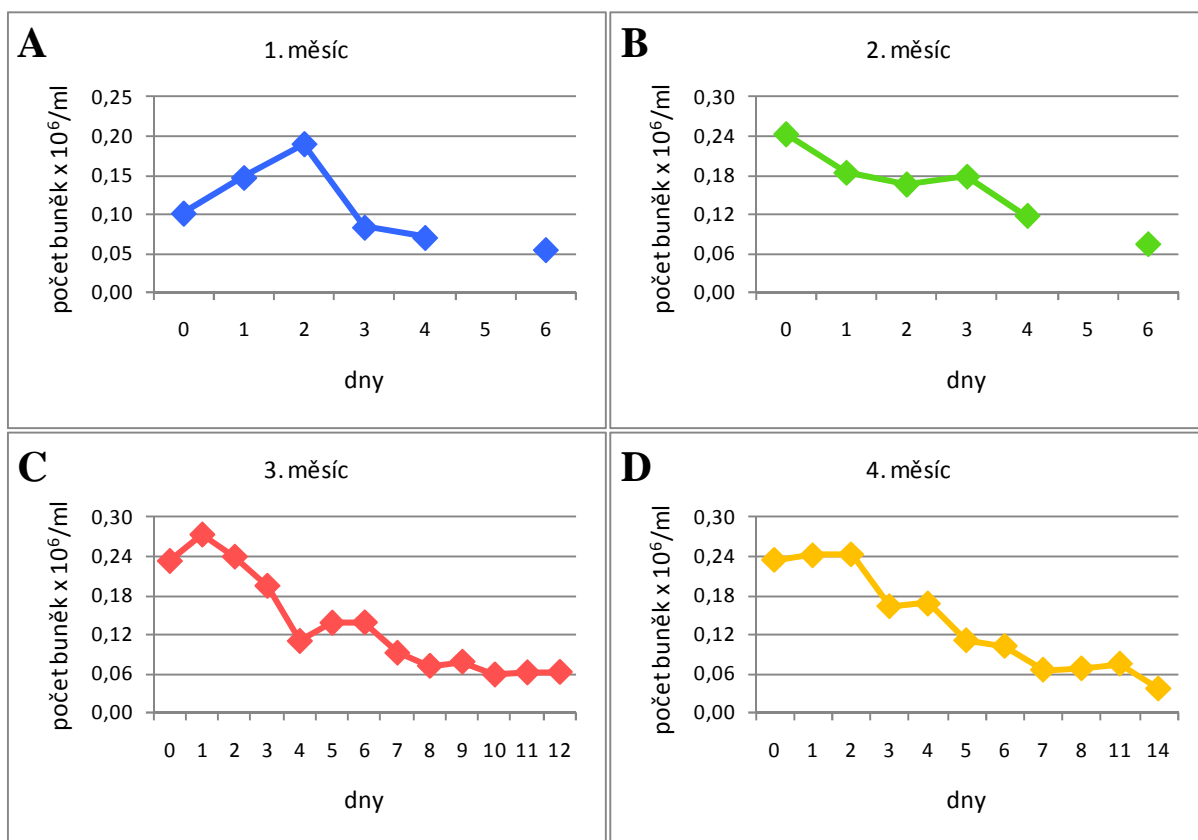


Graf 5. Růstová křivka ÚHKT-893 po roce od nasazení buněk pacienta 893 do kultury. Černě je proložená polynomická regresní křivka (stupeň 6).

4.5 Pokus o získání buněčné linie ÚHKT-893 nezávislé na IL-6

4.5.1 Kultivace v médiu bez IL-6

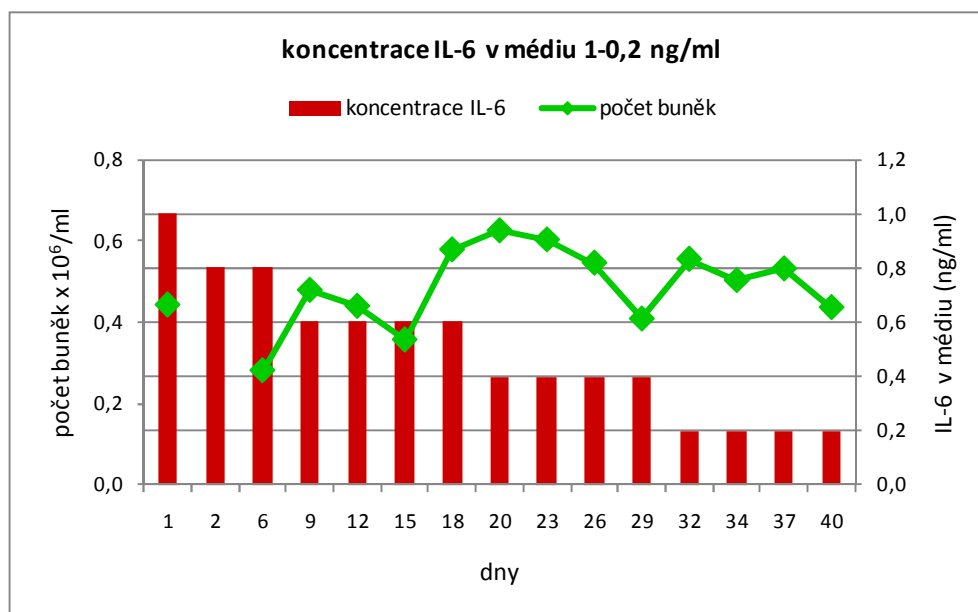
Kultivací buněk v médiu bez IL-6 se nepodařilo ustavit linii ÚHKT-893, která by byla nezávislá na tomto cytokinu. Ve všech pozorování jsme do týdne zaznamenali snížení počtu živých buněk pod $0,1 \times 10^6$ buněk/ml (Graf 6A-D). Nepozorovali jsme žádné výrazné změny v závislosti buněk ÚHKT-893 na absenci IL-6 mezi jednotlivými pokusy. Ve dvou případech ze čtyř pokusů byl pozorován viditelný nárůst počtu buněk 1-2 dny po jejich nasazení do tohoto pokusu, ovšem poté následoval jejich rychlý úbytek v počtu buněk (Graf 6A, C). V jednom případě nastal pokles okamžitě druhý den (Graf 6C). Během posledního pokusu se množství buněk drželo první 2 dny na konstantní hladině (Graf 6D).



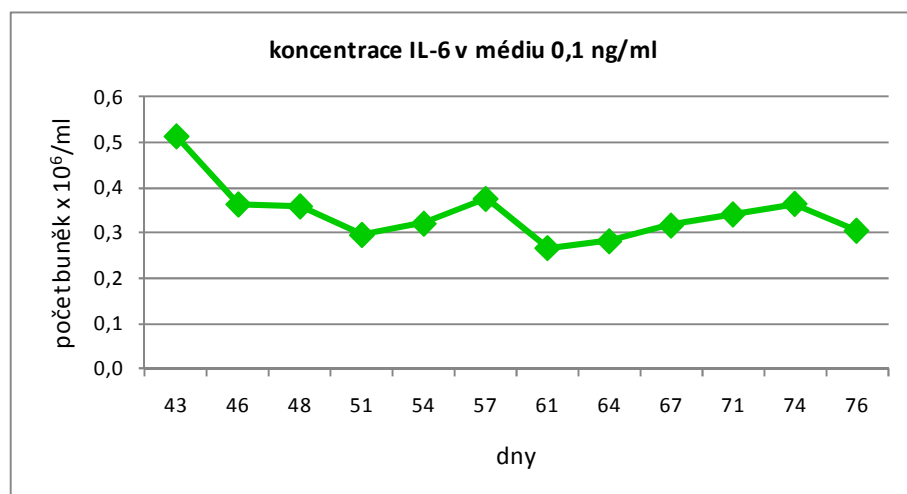
Graf 6A-D. Růstové vlastnosti buněk v kultuře bez IL-6. 1. měsíc kultivace odpovídá 11. měsíci od nasazení buněk pacienta 893 do kultury.

4.5.2 Postupné snižování koncentrace IL-6 v médiu

Pokus byl zahájen v průběhu 14. měsíce od založení kultury 893. Změny počtu buněk během pokusu jsou znázorněny v grafech 7-9. Druhý den pokusu byla snížena koncentrace IL-6 z 1 ng/ml na 0,8 ng/ml. Po určité době se buňky adaptovaly na nové podmínky a začaly proliferovat. Tento jev se opakoval při každém snížení koncentrace IL-6 a nepřesáhl dobu trvání 2 týdnů před dosažením koncentrace IL-6 v médiu 0,1 ng/ml (Graf 7). Následovala měsíční kultivace při koncentraci 0,1 ng/ml (Graf 8), která byla pravděpodobně kritická pro další vývoj, protože adaptace buněk měla pomalejší vývoj než v předchozích dnech a počet buněk už nepřesáhl $0,5 \times 10^6/\text{ml}$. Během tohoto měsíce klesl počet buněk pod $0,3 \times 10^6/\text{ml}$ (61. den kultivace), kdy byl nejnižším zaznamenaným za celou dobu pozorování.



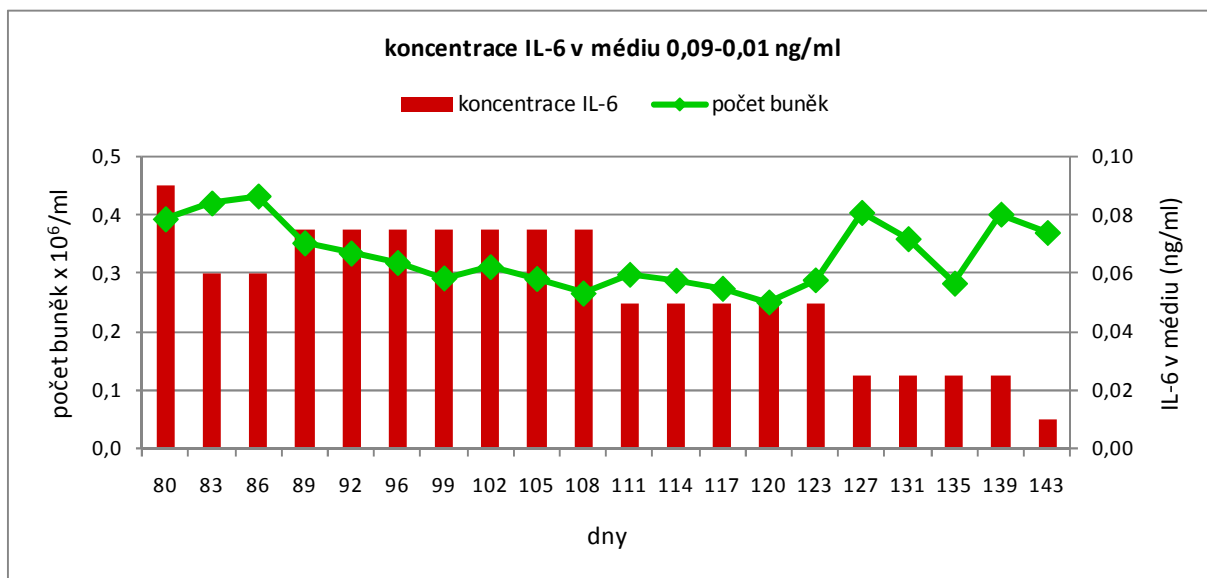
Graf 7. Kultivace buněk ÚHKT-893 v médiu s koncentrací IL-6 v rozmezí 1-0,2 ng/ml.



Graf 8. Kultivace buněk ÚHKT-893 v médiu s koncentrací IL-6 0,1 ng/ml.

Poté začaly buňky prosperovat, a když téměř dosáhly hranice $0,4 \times 10^6$ buněk/ml byla koncentrace IL-6 snížena na 0,09 ng/ml. Buňky nadále proliferovaly, a tak byla koncentrace IL-6 hned při dalším počítání (tj. po 3 dnech) snížena na 0,06 ng/ml za předpokladu, že takto malé rozdíly již pravděpodobně nemají na růst buněk tak velký vliv. Ovšem počet buněk po 6 dnech výrazně poklesl. Vnímavost buněk vůči snížení koncentrace IL-6 v médiu o 0,03 ng/ml, což odpovídalo snížení o 30%, byla tedy stále znatelná. Zvedli jsme proto koncentraci IL-6 na 0,075 ng/ml a čekali, až se buňky adaptují. Stav buněk se při této neměnné koncentraci IL-6 po 25 dnech zlepšil. Množství IL-6 bylo tedy sníženo na 0,05 ng/ml. Po 16 dnech při této koncentraci IL-6 počet buněk dosáhl opět hranice $0,4 \times 10^6$ /ml. IL-6 byla snížena na 0,025 ng/ml. Po 143 dnech od zahájení pokusu jsme se dostali na koncentraci

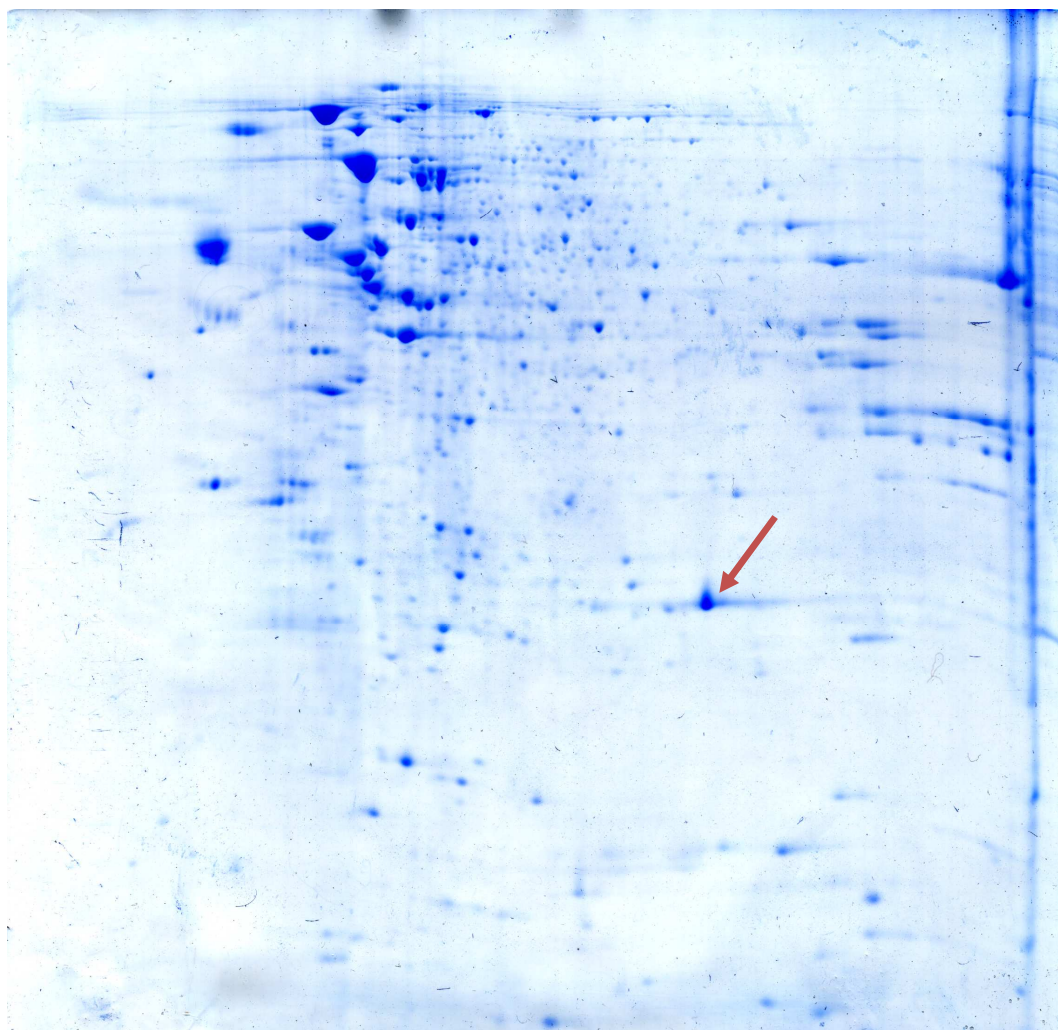
0,01 ng/ml IL-6 v médiu, což je setina původní koncentrace, při které jsou buňky standardně kultivovány.



Graf 9. Kultivace buněk ÚHKT-893 v médiu s koncentrací IL-6 v rozmezí 0,09-0,01 ng/ml.

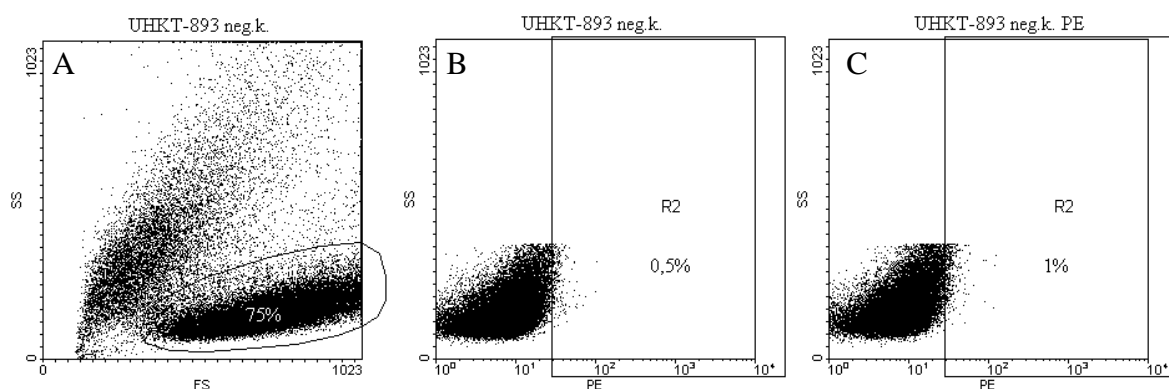
4.6 Sekrece imunoglobulinů

Pomocí nefelometrie bylo zjištěno, že buňky ÚHKT-893 sekretují IgG a volný lehký řetězec κ . Zároveň byla přítomnost intracelulárního lehkého řetězce κ stanovena na průtokovém cytometru a navíc proteinová analýza pomocí MS odhalila přítomnost oblasti JC lehkého imunoglobulinového řetězce κ v náhodně vybraném výrazném proteinovém spotu na gelu 2-D elektroforézy ($p < 0,05$; Obr. 11).



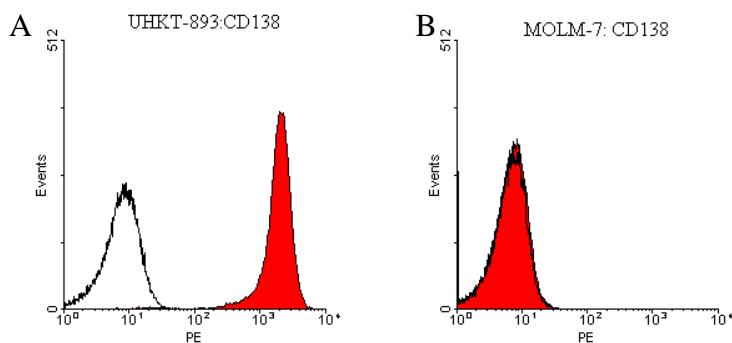
Obr. 11. Výsledný obarvený gel z 2-D elektroforézy. Šipkou je označen proteinový spot, který byl analyzován na hmotnostním spektrometru.

4.7 Charakterizace povrchových antigenů buněčné linie ÚHKT-893

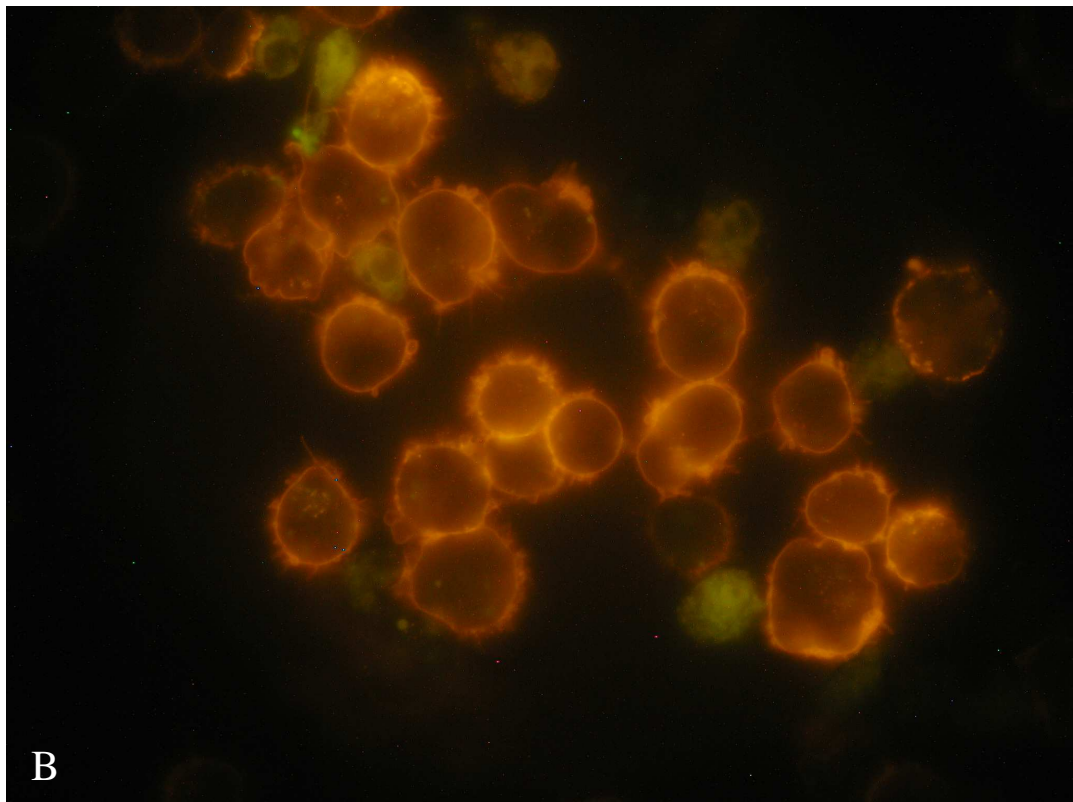
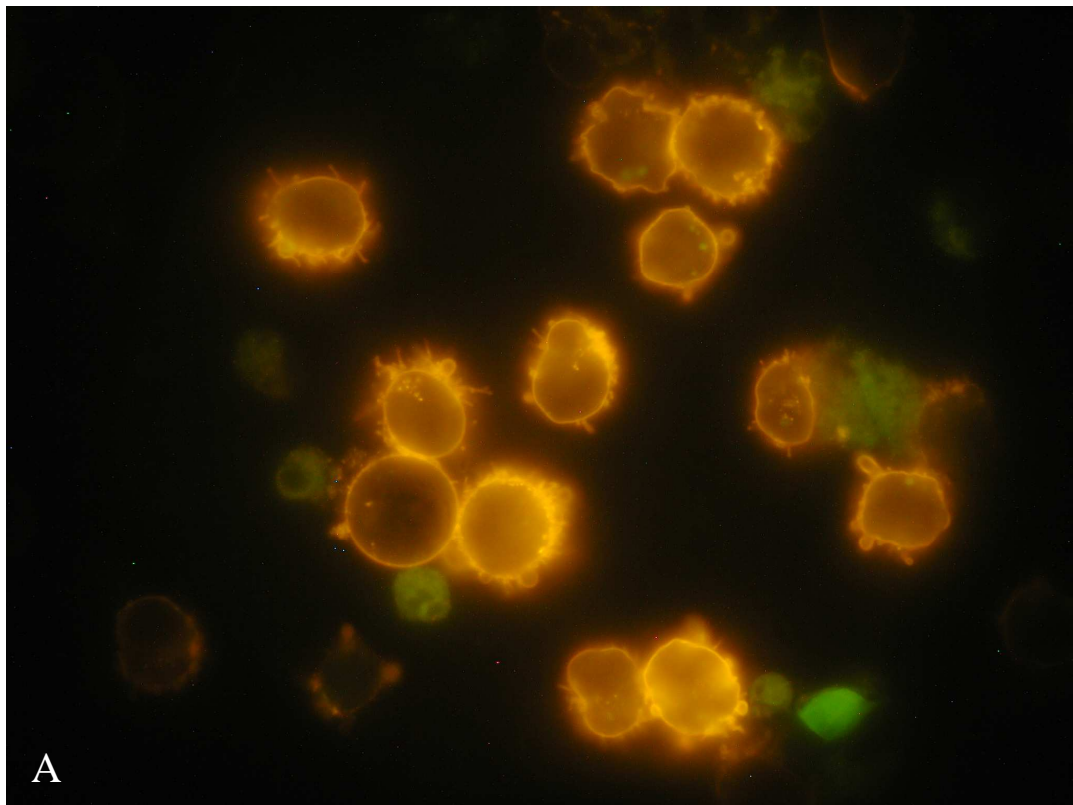


Graf 10A-C. Ukázka výběru regionů. Ze všech změřených buněk jsme v základním rozlišení SS x FS vybrali živou populaci (A). V rozlišení SS x PE jsme vymezili „pozitivní“ oblast za oblastí intenzity fluorescence neznačených buněk (B) a/nebo u vzorků značených pouze sekundární protilátkou (C). Ze statistických údajů jsme zaznamenali zanedbatelné procento buněk zasahujících do této oblasti.

Jako první antigen jsme měřili CD138, protože z krevních buněk jej exprimují na svém povrchu jen plasmatické buňky. Jak ukazují naměřené hodnoty z průtokového cytometru, je tento antigen na buňkách naší linie opravdu početně exprimován dle silné intenzity fluorescence, což potvrzují i fotografie z fluorescenčního mikroskopu (Obr. 12A-B).

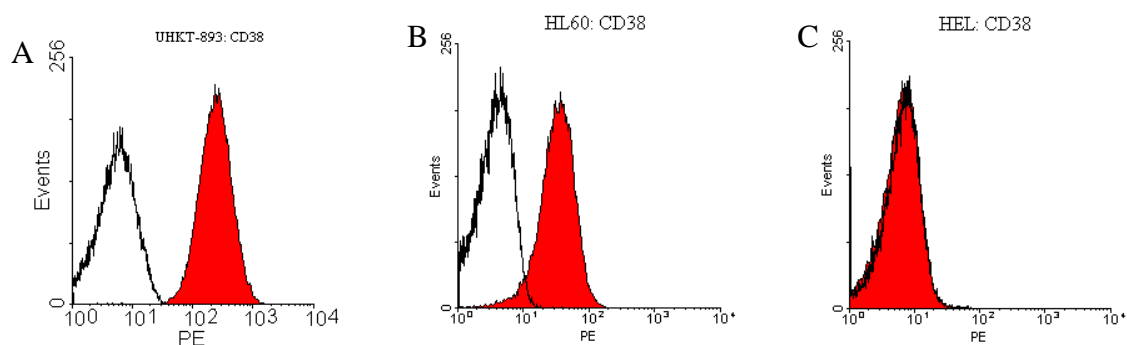


Graf 11A-B. CD138. Histogramy pochází z měření v 19. měsíci kultivace kultury 893. A: ÚHKT-893, B: negativní kontrolní linie.

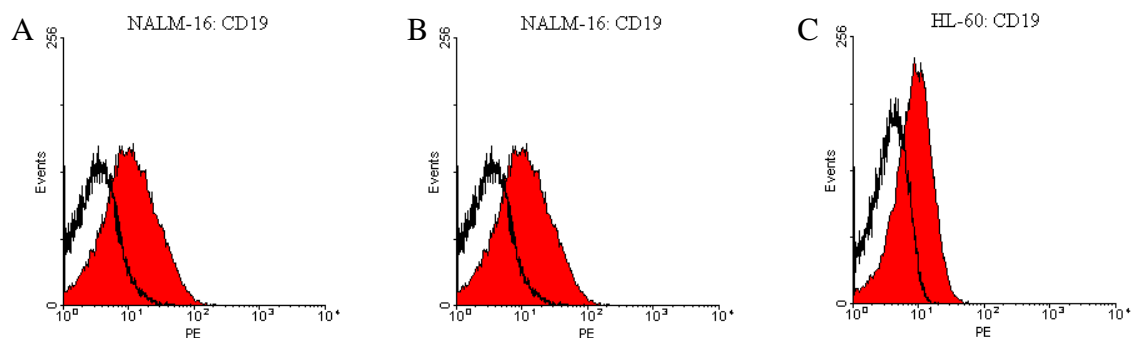


Obr. 12A-B. Exprese CD138 na buňkách ÚHKT-893. Protilátka anti-CD138-PE vydává výrazný oranžovo-zlatavý signál. Zeleně je patrná přirozená autofluorescence.

Z imunofenotypových znaků testovaných na buňkách MM nese linie ÚHKT-893 na svém povrchu molekuly CD138+, CD38+, CD20-, CD45 variabilní, CD56+, CD117- až slabě +. Výsledky jsou znázorněné v grafech 11, 12 a 14-17. Data zahrnující procento pozitivitu a průměrnou intenzitu fluorescence („sílu“ antigenu) vzorků i kontrol jsou uvedena v tabulce 6. Měřili jsme také, vedle antigenu CD45, další hypotetický diferenciační znak zralosti plasmatických buněk CD19, avšak výsledek nebyl průkazný, protože pozitivní ani negativní kontrola nevyšla podle očekávání (Graf 13A-C). V měření tohoto antigenu jsme dále nepokračovali, protože jsme již neměli danou protilátku k dispozici. Proto byl tento znak testován v rutinní laboratoři průtokové cytometrie.

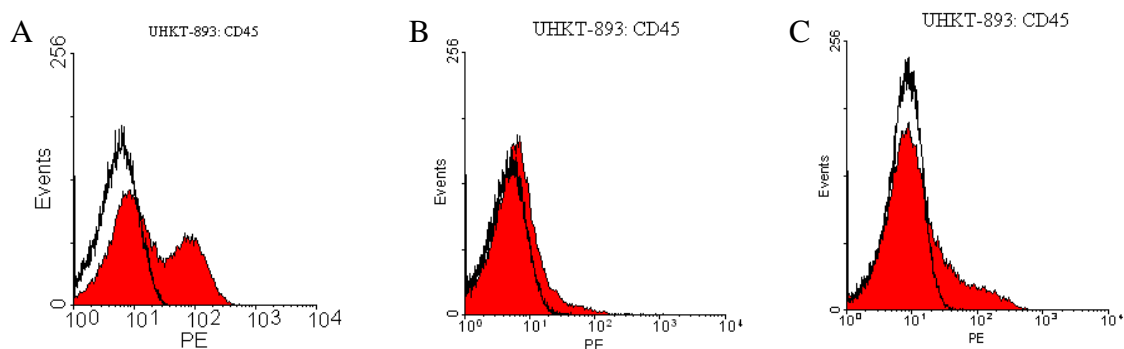


Graf 12A-C. CD38. A: ÚHKT-893, B: pozitivní kontrola, C: negativní kontrola.



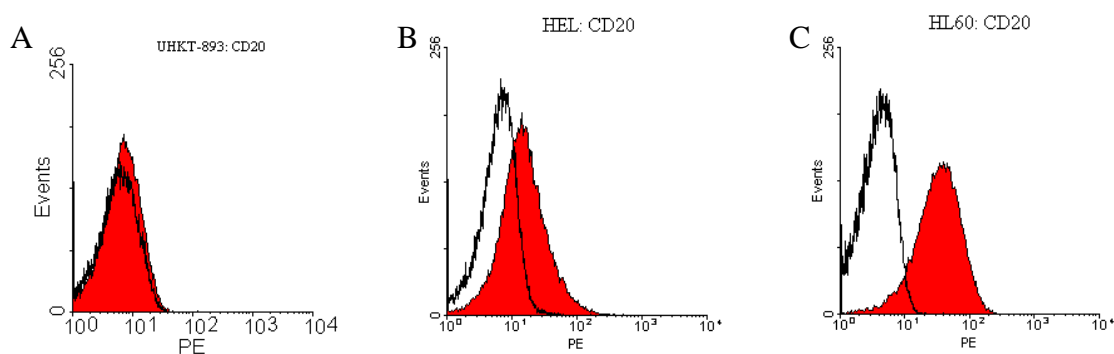
Graf 13A-C. CD19. Histogramy pochází z měření na začátku 18. měsíce kultivace kultury 893. A: ÚHKT-893, B: pozitivní kontrola, C: negativní kontrola.

Při prvním měření v rutinní laboratoři, tj. po 4 měsících kultivace, vyšel znak CD45 jasně pozitivní. Exprese ale nezůstala konstantní. V 16. měsíci kultivace jsme podle exprese CD45 detekovali 2 populace – pozitivní a negativní (Graf 14A). Při dalším měření byl znak CD45 téměř negativní – 7% pozitivních buněk (Graf 14B). Při ověřování tohoto výsledku bylo pozitivních buněk 17% (Graf 14C).



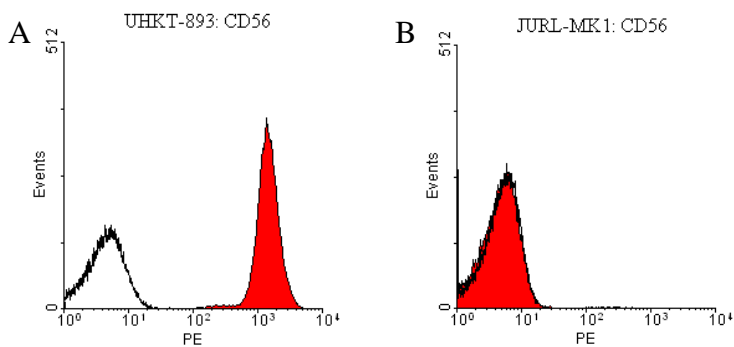
Graf 14A-C. Exprese CD45 na ÚHKT-893 v průběhu času. A: 16. měsíc kultivace, B: konec 18. měsíce kultivace, C: začátek 19. měsíce kultivace kultury 893.

Pozitivní kontrolou pro znak CD20 byly buňky HEL (Graf 15B). Jejich částečná pozitivita souhlasí s údaji publikovaných Drexlerem v roce 2001.⁷² Negativní kontrola HL-60 však vyšla pozitivní. Údaje postačili k ověření funkčnosti protilátky anti-CD20, a proto jsme stanovili naši linii jako CD20-.



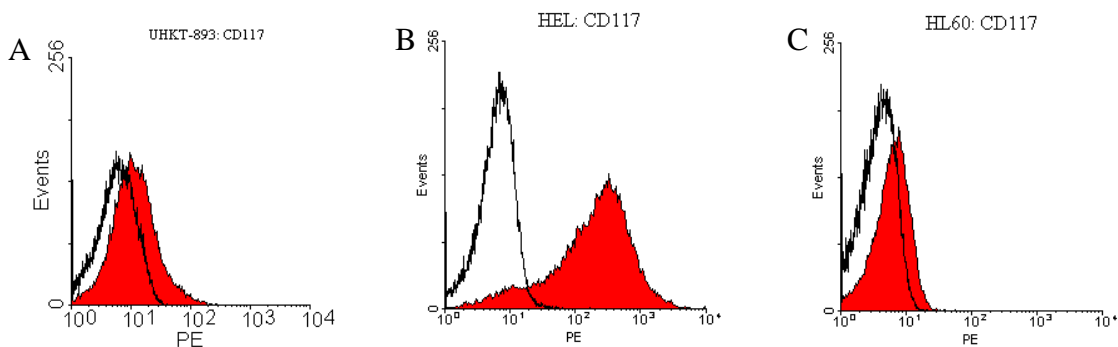
Graf 15A-C. CD20. A: ÚHKT-893, B: pozitivní kontrola, C: negativní kontrola.

Podle dat z rutinní laboratoře vykazoval znak CD56 po 4 měsících v kultuře půlenou pozitivitu (Tab. 6). Ale exprese tohoto antigenu nebyla stálá a časem velmi zesílila. Při našem měření na konci 18. měsíce byly buňky jasně silně pozitivní (Graf 16A-B).



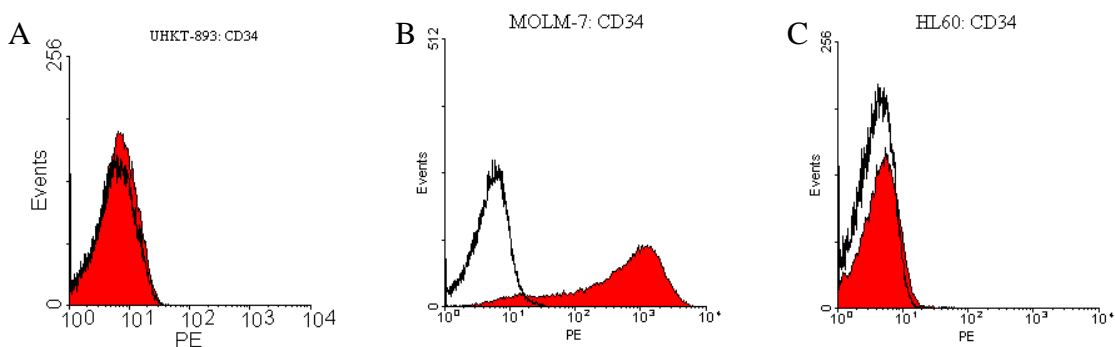
Graf 16A-B. CD56. A: ÚHKT-893, B: negativní kontrola.

Také znak CD117 byl nejdříve, ve 4. měsíci kultivace, změřen v rutinní laboratoři a byl pozitivní. Naše měření ukazují na úbytek této molekuly na povrchu buněk – výsledky ze začátku 16. měsíce jsou znázorněny v grafu 17A-C.



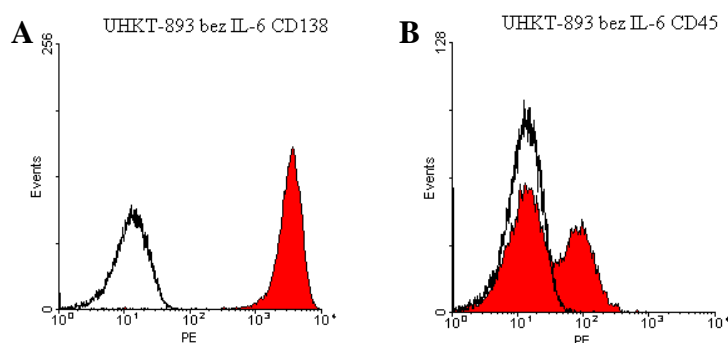
Graf 17A-C. CD117. Histogramy pochází z měření v 16. měsíci kultivace kultury 893. A: ÚHKT-893, B: pozitivní kontrola, C: negativní kontrola.

Mezi významnější antigeny jsme zařadili také CD34 (Graf 18A-C), tedy znak kmenových buněk.



Graf 18A-C. CD34. A: ÚHKT-893, B: pozitivní kontrola, C: negativní kontrola.

Znaky CD138 a CD45 jsme změřili také na buňkách ÚHKT-893, které jsme dlouhodobě kultivovali při snižující koncentraci IL-6 (Graf 19A-B). V době měření, tj. po 5 měsících kultivace, kdy bylo v médiu snižováno množství IL-6, a rok a půl od založení kultury 893, byly buňky přivyklé na koncentraci 0,025 ng/ml IL-6 v médiu. Nicméně 2 dny před měřením byly uchovány v médiu 0,2 ng/ml. Buňky vykazovaly pozitivitu CD138 s hodnotou GMean větší, než jakou jsme dosud naměřili na buňkách ÚHKT-893 kultivovaných standardně v médiu s 1 ng/ml IL-6 v médiu (Graf 19A, Tab. 6). Rozlišili jsme pozitivní (36%) a negativní populaci (64%) podle přítomnosti znaku CD45 na těchto buňkách (Graf 19B, Tab. 6).



Graf 19A-B. CD138 a CD45 na buňkách kultivovaných při snížené koncentraci IL-6.

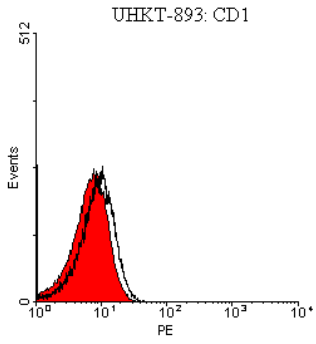
Tab. 6. Výsledné hodnoty imunofluorescence měřených antigenů včetně negativních kontrolních linií 1.

V tabulce jsou uvedena data míry pozitivivity (v %) a její průměrné hodnoty (GMean). Doba značí měsíc od začátku kultivace kultury 893. *- data změřená v rutinní laboratoři průtokové cytometrie, **- hodnoty naměřené na buňkách ÚHKT-893 kultivovaných při snížené koncentraci IL-6.

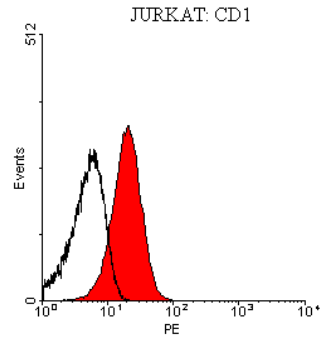
znak	doba	ÚHKT-893		pozitivní kontrola			negativní kontrola		
		poz.(%)	GMean	linie	poz.(%)	GMean	linie	poz.(%)	GMean
CD138	4,0*	+	-	-	-	-	-	-	-
	15,1	97	1978,68	-	-	-	-	-	-
	16,8	-	-	-	-	-	HL-60	90	55,26
	18,2	98	1704,89	-	-	-	HL-60	84	67,35
		98**	2887,25**				MOLM-7	0	6,37
							JURKAT	17	10,34
						NALM-16	96	200,27	
						CML-T1	45	16,57	
CD38	4,0*	+	-	-	-	-	-	-	-
	15,1	99	234,98	HL-60	92	31,83	-	-	-
	16,8	-	-	-	-	-	HEL	0	5,43
CD45	4,0*	+	-	-	-	-	-	-	-
	15,1	36	16,49	HL-60	97	109,71	-	-	-
	17,2	-	-	-	-	-	HeLa	0	9,86
	17,8	7	5,38	HL-60	98	53,35	-	-	-
	18,2	17	10,61	HL-60	99	183,92	-	-	-
		36**	24,69**						
CD19	16,8	0,5	4,93	-	-	-	HL-60	9	5,53
	17,2	2	6,81	NALM-16	38	9,53	HL-60	24	7,77
	18,0*	-/(+)	-	-	-	-	-	-	-
CD20	15,1	1	6,08	HEL	34	14,65	HL-60	86	31,42
CD34	15,1	0	5,68	MOLM-7	89	360,39	HL-60	2	3,84
CD56	4,0*	+/-	-	-	-	-	-	-	-
	17,8	99	1395,03	-	-	-	JURL-MK1	1	4,20
CD117	4,0*	+	-	-	-	-	-	-	-
	15,1	15	10,97	HEL	88	164,64	HL-60	7	5,54

Z měření dalších znaků jsme zjistili, že linie ÚHKT-893 má povrchový fenotyp CD1-, CD3-, CD4-, CD5-, CD9-, CD10-, CD13-, CD15-, CD21-, CD24-, CD33-, CD44+, CDw65- a HLA-DR- (Grafy 20A-C a 21A-B). Data zahrnující procento pozitivivity a průměrnou intenzitu fluorescence („sílu“ antigenu) vzorků i kontrol jsou uvedena v tabulce 7.

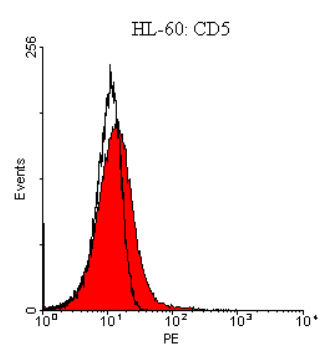
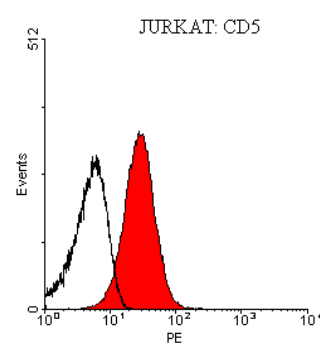
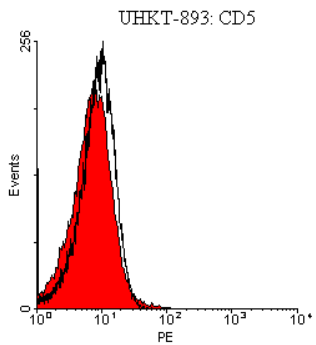
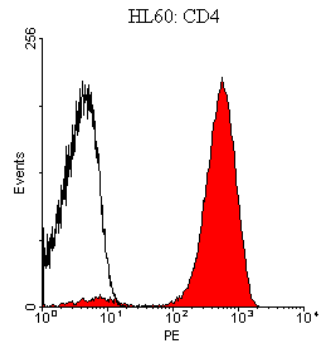
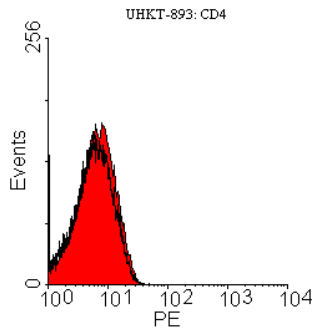
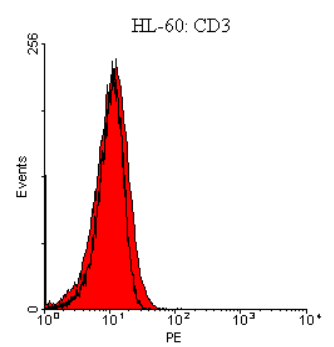
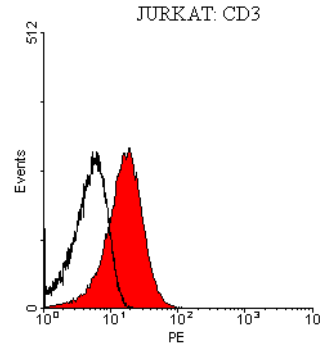
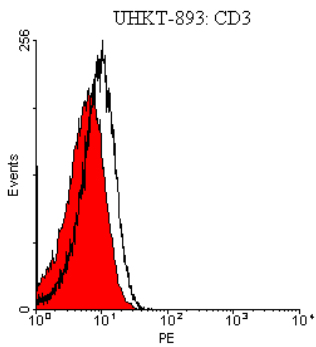
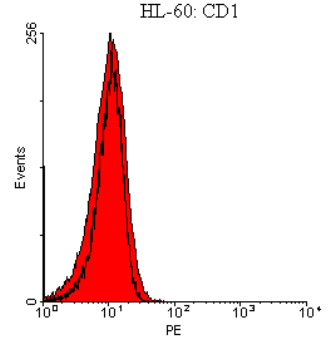
A

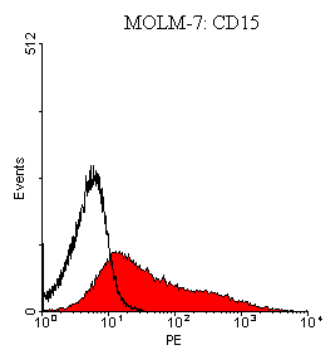
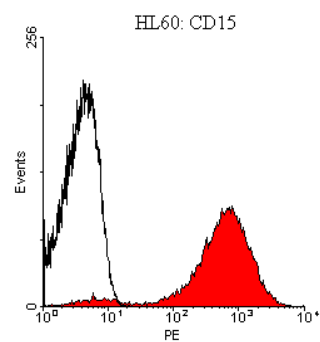
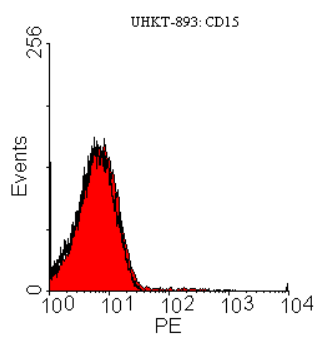
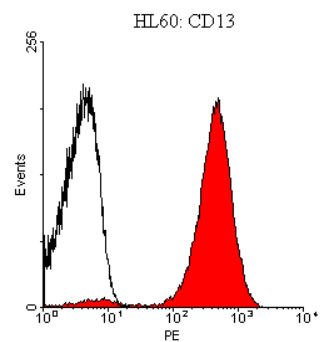
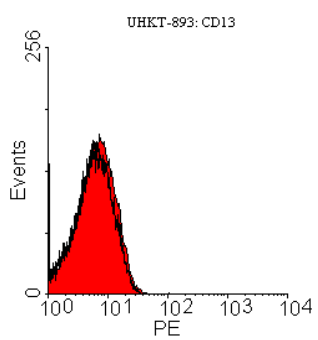
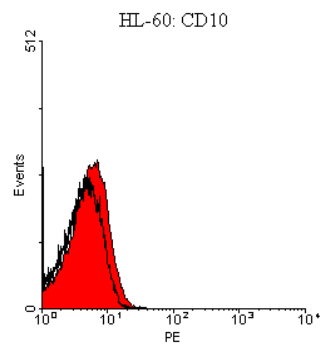
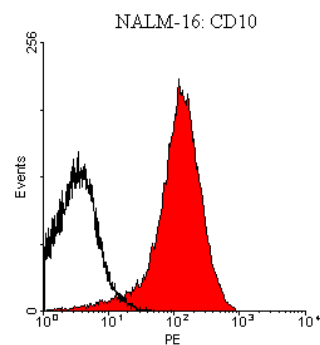
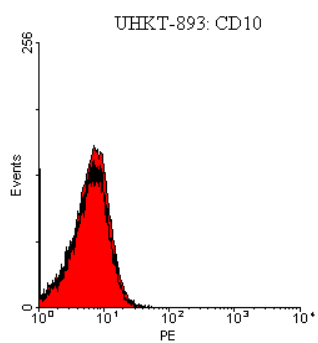
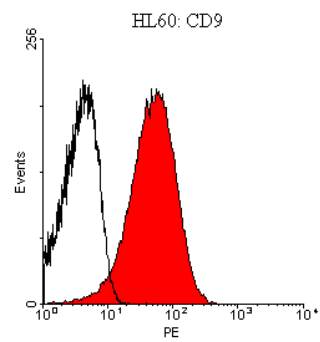
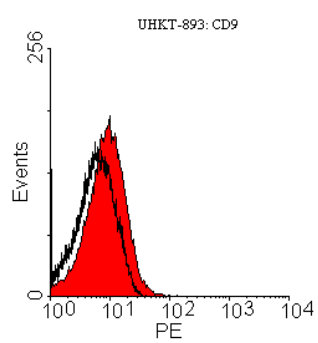


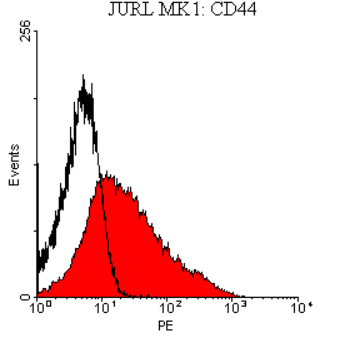
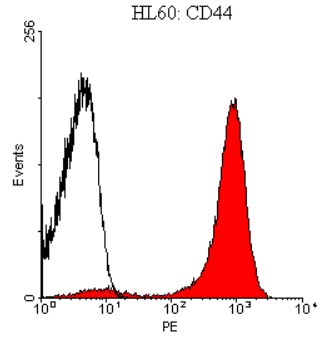
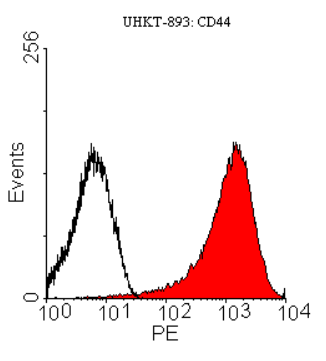
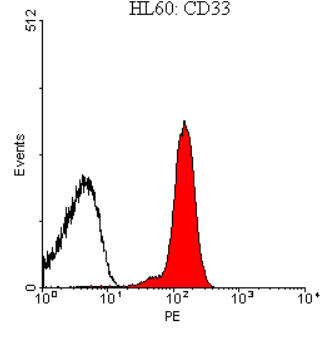
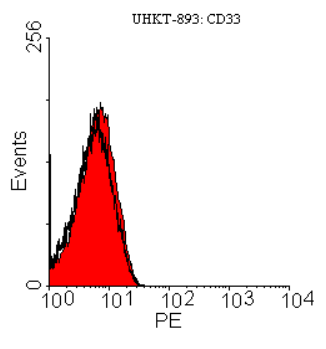
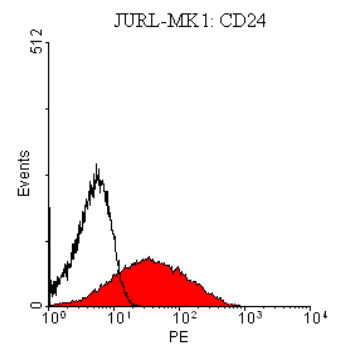
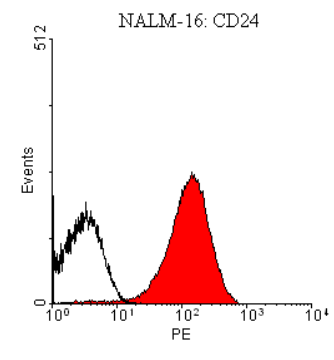
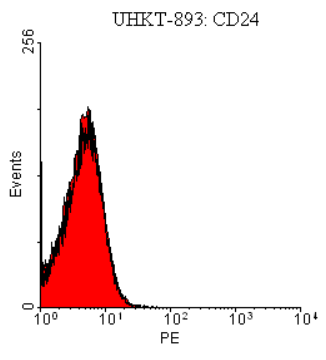
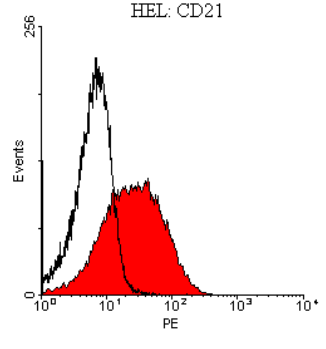
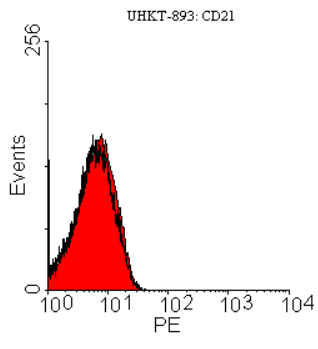
B

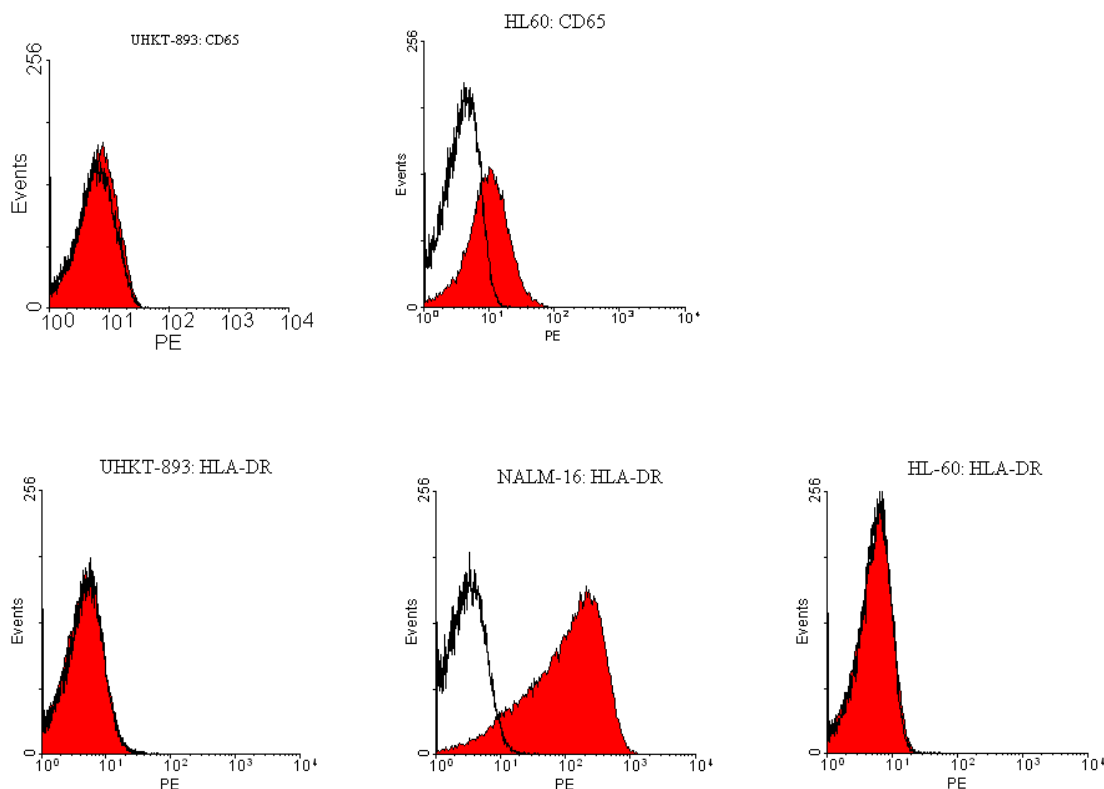


C

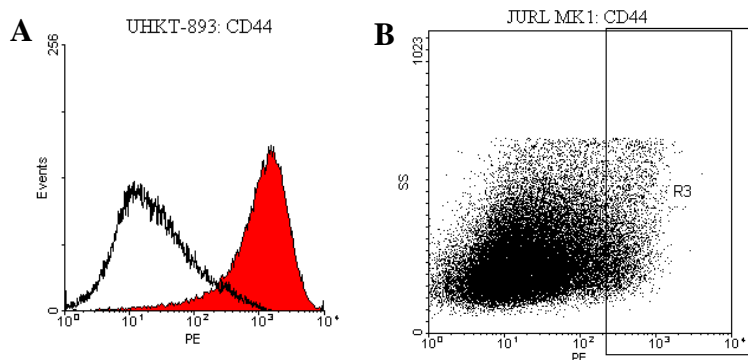








Graf 20A-C. CD1, CD3, CD4, CD5, CD9, CD10, CD13, CD15, CD21, CD24, CD33, CD44, CDw65, HLA-DR. V jednotlivých sloupcích: ÚHKT-893 (A), pozitivní kontrola (B), negativní kontrola (C).



Graf 21A-B. Určení pozitivity CD44 u buněk ÚHKT-893. A: Histogram s červenou výplní znázorňuje pozitivitu těchto buněk a byl proložen histogramem buněk JURL-MK1 (bezbarvá výplň) rovněž značených na CD44. B: Nový region pro pozitivní buňky v diagramu dot plot.

U CD44 jsme postupovali pozměněným způsobem, protože negativní kontrola ke znaku CD44 - linie JURL-MK1 - byla z 50% pozitivní. Proložili jsme tedy křivku ÚHKT-893 křivkou JURL-MK1 ve společném histogramu a usoudili, že výslednou pozitivitu buněk ÚHKT-893 lze považovat za platnou i za předpokladu, pokud se nejedná o skutečnou aktivaci exprese CD44 u buněk JURL-MK1, kdy by pozitivita buněk JURL-MK1

představovala nespecifické vazby (Graf 20A). V grafickém zobrazení dot plot SS x PE linie ÚHKT-893 byl vytvořen nový pozitivní region pro tuto linii podle zřetelně ohraničené populace pozitivních buněk (graf zde není znázorněn). Míra přesahu JURL-MK1 do tohoto regionu činila 7% (Graf 20B). Dále se postupovalo ke konečné hodnotě positivity jako u ostatních povrchových znaků (Tab. 7).

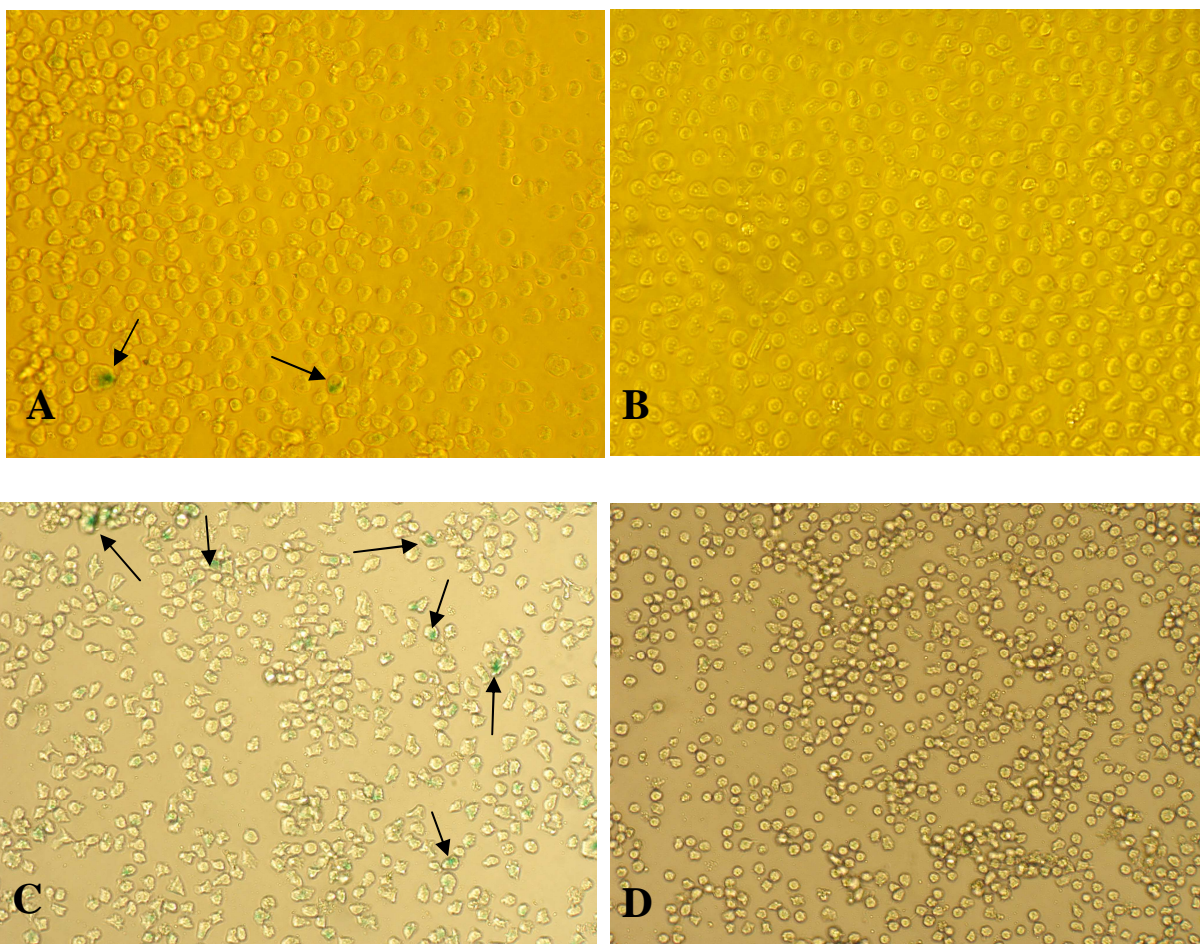
Tab. 7. Výsledné hodnoty imunofluorescence měřených antigenů včetně negativních kontrolních linií 2.

V tabulce jsou uvedena data míry positivity (v %) a její průměrné hodnoty (GMean). Doba značí měsíc od začátku kultivace kultury 893. *- data změřená v rutinní laboratoři průtokové cytometrie.

znak	doba	ÚHKT-893		pozitivní kontrola			negativní kontrola		
		poz.(%)	GMean	linie	poz.(%)	GMean	linie	poz.(%)	GMean
CD1	18,2	0	6,19	JURKAT	68	19,46	HL-60	3	9,53
CD3	4,0*	neg.	-	-	-	-	-	-	-
	18,2	0	4,82	JURKAT	53	15,39	HL-60	5	10,22
CD4	4,0*	-/(+)	-	-	-	-	-	-	-
	15,1	0,5	5,77	HL-60	95	405,47	-	-	-
CD5	18,2	1	6,50	JURKAT	87	28,28	HL-60	16	13,13
CD8	4,0*	+/-	-	-	-	-	-	-	-
CD9	15,1	5	8,10	HL-60	93	47,61	-	-	-
CD10	17,2	0	5,73	NALM-16	96	109,91	HL-60	3	4,53
CD13	15,1	0,5	5,66	HL-60	96	345,45	-	-	-
CD15	15,1	0,5	5,66	HL-60	93	413,75	MOLM-7	58	40,18
CD21	15,1	0	5,63	HEL	58	23,84	-	-	-
CD24	17,8	0	3,82	NALM-16	95	112,20	JURL-MK1	71	33,59
CD28	4,0*	neg.	-	-	-	-	-	-	-
CD33	15,1	0	5,50	HL-60	97	126,59	-	-	-
CD44	16,8	84	961,52	HL-60	94	523,05	JURL-MK1	49	21,93
CDw65	15,1	0,5	5,76	HL-60	32	9,08	-	-	-
HLA-DR	17,8	0	3,70	NALM-16	88	84,97	HL-60	1	4,65

4.8 Zjišťování míry senescence buněk ÚHKT-893

Ustavené permanentní buněčné linie mají schopnost neomezené proliferace, proto u nich neočekáváme přítomnost senescentních buněk, které tuto schopnost ztratily. Orientačně jsme provedli měření míry senescence buněk linie ÚHKT-893 (Obr. 13, Tab. 9).



Obr. 13A-D. Měření senescence buněk linie ÚHKT-893. Šipky označují senescentní buňky. V 11. měsíci kultivace jsme při jednom z měření získali hodnoty 1,6% senescentních buněk u linie ÚHKT-893 (A) a 0% senescentních buněk u kontrolní linie HL-60 (B). Ve 12. měsíci jsme naměřili 4% senescentních buněk u linie ÚHKT-893 (C) a 0% senescentních buněk u kontrolní linie HL-60 (D). Zvětšení 20x10x1,5.

Během 4měsíčního pozorování nebyl z naměřených hodnot patrný očekávaný trend snížení počtu senescentních buněk, jako znak selekce linie směrem k vyšší míře její ustálenosti (Tab. 8). Počet senescentních buněk ÚHKT-893 pouze kolísal v rozmezí přibližně 1-15%. Důvodem, proč se výsledky jednotlivých měření mezi sebou lišily, mohla být labilně subjektivní rozhodování, zda je nebo není buňka senescentní, hustota a kondice buněk odebraných z kultury pro testování.

Tab. 8. Míra senescence buněk ÚHKT-893. Hodnoty jsou uvedeny v procentech.

	1. měření	2. měření
1. měsíc	3,7	1,6
2. měsíc	< 1	4
3. měsíc	10,5	15,7
4. měsíc	13	5,2

5 Diskuze

Ustavení nové myelomové linie je velkým úspěchem, ačkoli je to do značné míry dílem náhody. Faktorů, které zde mohou hrát roli, je mnoho – stádium nemoci pacienta, ve kterém byly buňky odebrány, množství nasazených buněk do kultury, množství nádorových buněk s proliferačním potenciálem, podíl normálních prekurzorů granulocytů v kultuře, reaktivace EBV, množství stromálních buněk produkujících podpůrné cytokiny, intervaly mezi výměnami média a další. Kultury 893 nevykazovaly během prvních týdnů žádné zvláštní známky v růstu nebo ve své morfologii, podle kterých bychom mohli usoudit, že se z nich rozvine buněčná linie. Mnohé jiné kultury byly na svém počátku zajímavější např. velkým podílem plasmatických buněk nebo jejich pozoruhodnou velikostí. V době, kdy jsme zaregistrovali, že by se kultura 893 v médiu s růstovým faktorem G-CSF mohla rozvinout v linii, jsme si kladli otázku, jak vypadají buňky v druhé kultuře v médiu bez G-CSF. Ovšem tuto kulturu jsme odstranili na konci 3. týdne kultivace pro její celkový úpadek. Co způsobilo, že kultura přerostla v novou linii v médiu s G-CSF a naopak, že bez tohoto cytokinu strádala? Mohl tomu přispět fakt, že pacientka prodělala přípravnou mobilizační chemoterapii pro ASCT, při které byl použit G-CSF? G-CSF mohl také nepřímo přispět k vytvoření optimálního mikroprostředí pro plasmatické buňky působením na granulocyty a stromální buňky. Přestože nemůžeme tyto možnosti vyloučit, je jasné, že G-CSF nebyl pro další vývoj kultury-linie zásadní, protože tím hlavním růstovým faktorem této linie je IL-6. Při zakládání nových kultur s rozvíjející se linií 893 se ukázalo, že buňky strádaly a kultury nakonec zanikly bez ohledu na přítomnost G-CSF. Výjimkou byly první 2 lahvičky, kde byla vytvořena podpůrná adherentní stromální vrstva. Je nanejvýš pravděpodobné, že tato stromální vrstva produkovala IL-6 stejně, jak popisuje Minges Wols ve své práci⁵¹. V těchto původních „zásobních“ lahvičkách buňky přetrvávaly a rostly, dokud jsme médium neobohatili o rekombinantní IL-6, který zajistil kontinuální růst a vývoj linie nezávisle na stromální vrstvě a G-CSF v nově založených kulturách bez stromálních buněk. Pokusy o ustanovení linie, zhruba rok staré, přenesením buněk do média bez IL-6 s cílem získat ÚHKT-893 nezávislou na tomto cytokinu, byly nespěšné (Graf 6A-D). Snaha o dosažení myelomové linie, která by byla v jedné variantě závislá na IL-6 a ve druhé nikoliv, je však zajímavým cílem. Získali bychom tak unikátní materiál ke studiu MM a působení IL-6. Založili jsme proto pokus, kdy jsme množství IL-6 v médiu postupně snižovali vždy, když se buňky adaptovaly na novou koncentraci. Tento pokus zatím nedospěl ke svému cíli, nicméně buňky v současné době přivykají na koncentraci 0,01 ng/ml IL-6 v médiu, což je 1%

z původního množství, při kterém jsou buňky standardně kultivovány. Poslední hladina IL-6, při které kultura začala narůstat, byla 0,025 ng/ml.

Data o tvorbě a sekreci IgG a volného řetězce κ získaná pomocí nefelometrie a průtokové cytometrie byla shodou okolností podpořena hmotnostní spektrometrií analýzou náhodně vybraného proteinu, který jsme vyřízli z gelu po 2-D elektroforéze. Šlo o příležitostnou analýzu v rámci praktického cvičení a bez záměru detekce konkrétního proteinu. Vybrali jsme výraznou proteinovou skvrnu na 2-D elektroforéze, která upoutala naši pozornost.

Při imunofluorescenčním značení jsme neměli k dispozici izotypové kontroly. Naše úsilí v ojedinělých případech ztroskotalo i na údajích, jako je typ izotypu nebo častěji koncentrace protilátky, které nebyly dohledatelné ani prostřednictvím dodavatelské firmy vzhledem k pokročilému stáří skladované, přesto funkční, protilátky. Alternativně jsme proto použili ke každému testovanému znaku jako pozitivní a negativní kontrolu linii, kterou jsme měli v laboratoři a u které je známa exprese daného znaku (viz především přehled leukemických a lymfomových linií⁷²).

Analýzou povrchových molekul jsme v první řadě potvrdili, že buňky linie ÚHKT-893 jsou plasmatické buňky – CD138+ a CD38+ (Graf 11A a 12A, Obr. 12, Tab. 6). Pro znak CD138 jsme jako negativní kontrolu využili nejprve linii HL-60. Ovšem výsledek z průtokového cytometru načel 90% pozitivitu (Tab. 6). Protože jde o stěžejní znak, použili jsme při dalším měření kromě HL-60 i jiné linie ustavené z buněk krevní řady (MOLM-7, NALM-16, CML-T1 a JURKAT). U všech těchto linií jsme předpokládali negativitu ve znaku CD138, protože tento znak je pro plasmatické buňky z krevní buněčné řady jedinečný. Přesto čistě negativní byla pouze linie MOLM-7 (Graf 11B). Pozitivita CD138 u ostatních linií vyvolává řadu otázek. Mohlo dojít u těchto linií ke změně fenotypu v důsledku dlouhého držení v kultuře a značné prokultivovanosti? Nebo se spíše jedná o nespecifické vazby? Vzhledem k tomu, že jsme u ostatních znaků málokdy zaznamenali takovou pozitivitu a protože linie MOLM-7 byla čistě CD138-, mohli bychom vyloučit možné nespecifické vazby primární protilátky a usuzovat spíše na expresi molekuly CD138 u kontrolních linií, které by měly být pro tento znak negativní. Vzhledem k tomu, že GMean CD138 u linie ÚHKT-893 byl několikanásobně vyšší než GMean u těchto kontrolních linií, nemusíme mít o pozitivitě naší linie pochybnosti. Navíc byla potvrzena i v rutinní laboratoři průtokové cytometrie.

Expresí CD45 a CD19 na plasmatických buňkách by měla odrážet vývojový stav plasmatických buněk.^{39,41} Někteří autoři ovšem uvádí, že normální plasmatické buňky exprimují na svém povrchu CD19 a její absence je známkou aberace u MGUS nebo MM^{35,42-45,73}. Už Harada et al.⁴⁴ v roce 1993 rozlišuje normální plasmatické buňky CD19+, CD56- a maligní plasmatické buňky CD19-, CD56+, přičemž mezi myelomovými buňkami pacientů s MM nebyly žádné CD19+, CD56-, avšak u pacientů s MGUS byly nalezeny obě populace. Almeida et al.⁴² uvádí, že většina plasmatických buněk ve zdravé kostní dřeni je CD19+ a zároveň že plasmatické buňky pacientů s MM jsou obvykle CD19-. Rawstron et al.⁴³ udává >70% plasmatických buněk zdravých lidí jako CD19+ a 95% plasmatických buněk CD19- u pacientů s MM. Podle těchto informací ale stále nemůžeme vyloučit, že by zbytek plasmatických buněk byl pouze v jiném diferenciacním stádiu. U zdravých lidí by to znamenalo <30% plně diferencovaných „zralých“ plasmatických buněk. U pacientů s MGUS nebo MM, kterým expandují plasmatické buňky, může absence CD19 na těchto buňkách značit právě rozvoj konečných diferenciacních stádií, přičemž u MGUS expanze těchto plasmatických buněk není ještě tolik markantní. Tomu nasvědčují i výsledky Kovářové et al.⁷⁴, kde nejvíce plasmatických buněk v terminálním diferenciacním stádiu detekovali u pacientů s pokročilým MM. Tyto buňky určovali podle exprese CD38+ a CD45-. CD19 do tohoto profilu nezahrnuli, protože jej používali jako diferenciacní znak mezi maligními a normálními plasmatickými buňkami. Více studií tedy uvádí absenci CD19 jako znak malignity plasmatických buněk u MGUS a MM. Podle námi naměřených hodnot byly buňky ÚHKT-893 CD19-, nicméně jsme nemohli z těchto dat učinit konečný závěr, protože kontrolní linie nevyšly podle očekávání (Graf 13A-C). Nechali jsme si proto tento znak změřit v rutinní laboratoři průtokové cytometrie. Výsledky ukázaly velmi slabou expresi molekuly CD19. Expresí CD45 během více jak roční kultivace klesala. Po 4 měsících v kultuře byly buňky CD45+, za dalších 11 měsíců jsme zřetelně rozlišili 2 populace, CD45- a CD45+, a při posledních 2 měření, která jsme prováděli kolem 18. měsíce kultivace, bylo pozitivních buněk <20%. Mahmoud et al.⁷⁵ ukázal, že expresí CD45 u myelomových linií koreluje se závislostí na přítomnosti IL-6. Na tento cytokin odpovídaly růstem buňky CD45+. Naopak buňky CD45- odpověděly na přítomnost IL-6 v médiu změnou ve fenotypu a zahájily expresi CD45. Když byl IL-6 těmto buňkám odebrán, buňky znak CD45 opět ztratily. Podle další studie, myelomové buňky se silnou expresí CD45 vykazovaly na svém povrchu více receptorů pro IL-6.⁷⁶ Podle našich výsledků expresí CD45 na buňkách ÚHKT-893 klesala v přítomnosti IL-6. Zdali je tato změna v souladu s nižší závislostí na IL-6 nebylo zatím prokázáno, protože přenesení buněk z média s IL-6 do média bez něj v období mezi 11.

a 15. měsícem kultivace vedlo k zániku buněk. Ovšem je nutné toto ještě prověřit. Při testování CD45 u buněk ÚHKT-893, kterým byla během 6 měsíců snižována dávka IL-6, byly nalezeny 2 populace (CD45+ a CD45-, Graf 19B) tak, jak tomu bylo u buněk pěstovaných s IL-6 během 15. měsíce kultivace (Graf 14A). K posouzení, zdali míra exprese CD19 a CD45 odráží diferenciační stádium nebo jiné vlastnosti, nemáme v současné době dostatek relevantních dat. Změnu exprese jsme zaznamenali také u adhezivní molekuly CD56. Nestabilita tohoto antigenu je u pacientů s MM známá. Pacienti s absencí exprese molekuly CD56 mají agresivnější průběh nemoci.³² Byly zaznamenány změny v expresi, které se projeví jak ztrátou CD56, tak jeho získáním.⁴⁰ Zpočátku, ve 4. měsíci v kultivace kultury 893, vykazovaly buňky půlenou pozitivitu. Při dalším testování téměř po 18 měsících kultivace jsme změřili 99% pozitivitu znaku CD56 (Graf 16A) a intenzita fluorescence (GMean) tohoto znaku byla ve srovnání s ostatními testovanými znaky druhá nejsilnější hned po znaku CD138 (Tab. 6 a 7).

Byla pozorována částečná pozitivita CD20 u některých pacientů s MM^{35,42}, avšak naše linie byla na tento znak negativní (Graf 15A, Tab. 6). Výsledek byl posouzen vůči pozitivní kontrole – linii HEL, která jako jediná z dostupných linií vykazovala podle Drexlera⁷² alespoň částečnou pozitivitu, kterou jsme potvrdili (Graf 15B). Naprosto stejná situace nastala u znaku CD21. Později jsme s překvapením zaregistrovali, že v novější verzi Drexlerova přehledu linií⁵⁹, je linie HEL označena jako CD20- a CD21-. Nízká aberantní exprese CD117 souhlasí s dříve publikovanými údaji.^{35,42,43,46} Obecně se považuje za platné, že plasmatické buňky neexprimují CD34. Kuranda et al.⁷⁷ však ve své práci detekoval minoritní část plasmatických buněk, které jsou CD34+. U naší linie jsme ale sebemenší expresi CD34 nezjistili. Při testování dalších povrchových antigenů byly buňky ÚHKT-893 CD1-, CD3-, CD4-, CD5-, CD8+/-, CD9-, CD10-, CD13-, CD15-, CD21-, CD33-, CD44+ (z 84%), CDw65- a HLA-DR-. CD44 je adhezivní molekula, která pomáhá myelomovým buňkám v osidlování kostní dřeně. Negativní kontrola u CD44 byla sice z téměř 50% pozitivní, avšak když jsme proložili histogramy této kontrolní linie JURL-MK1 a námi ustavené linie ÚHKT-893, překrývaly se obě pouze ze 7% (Graf 21A-B, Tab. 7).

Změnu exprese povrchových molekul se nám pomocí průtokové cytometrie podařilo zachytit u znaků CD45, CD56 a CD117.

Z měření míry senescence můžeme usuzovat, že linie ÚHKT-893 má malou spontánní senescenci. Aktuální poměr senescentních buněk vůči normálním se může projevovat vlivem ještě ne zcela ustálené linie a/nebo může odrážet i stav buněčné kultury, např. zda byly odebrané před nebo po výměně média.

6 Závěr

Dosažené výsledky dlouhodobých kultivací biopsií kostní dřeně nemocných s myelomem jednoznačně potvrzují výjimečnost a náhodnost možnosti vzniku permanentních buněčných linií neoplastických buněk. Z 96 primárních kultur se podařilo ustavit 7 EBV+ lymfoblastoidních linií, které zpravidla pocházejí z normálních B buněk, a dokonce jednu permanentní linii, ÚHKT-893, s prokazatelným charakterem myelomových plasmatických buněk.

Vlastnosti plasmatických myelomových buněk jsme u této nově ustavené linie prokázali přítomností diskriminačních povrchových znaků plasmocytů (především CD138+, CD38+) pomocí průtokové cytometrie, zhodnocením buněčné morfologie pomocí mikroskopie a barvení Giemsou a zjištěním produkce monoklonálního imunoglobulinu IgG_k pomocí nefelometrie, hmotnostní spektrometrie a průtokové cytometrie. Jedním z dokladů toho, že jde o ustavenou permanentní linii leukemických buněk, je více než roční (80 týdnů dlouhá) kontinuální propagace těchto buněk v kultuře. Pokusy o vypěstování sublinie ÚHKT-893 nezávislé na přítomnosti IL-6 byly dosud neúspěšné. Buňky neustále vyžadují pro svůj růst a dělení dodávání alespoň minimálního množství (0,025 ng/ml) IL-6, pro optimální růst v kultuře pro potřeby experimentů min. koncentraci 1 ng/ml. Linie stará 15 měsíců ještě vykazovala známky spontánní senescence.

7 Literatura

1. Straub, J. et al. Mnohočetný myelom - časná diagnostika. *Med. Pro Praxi* **6**, 197-199 (2009).
2. Kyle, R.A. & Rajkumar, S.V. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br. J. Haematol* **134**, 573-589 (2006).
3. Mahindra, A., Hideshima, T. & Anderson, K.C. Multiple myeloma: biology of the disease. *Blood Rev* **24 Suppl 1**, S5-11 (2010).
4. Morse, D., Dailey, R.C. & Bunn, J. Prehistoric multiple myeloma. *Bull N Y Acad Med* **50**, 447-458 (1974).
5. Solly, S. Remarks on the pathology of mollities ossium; with cases. *Med Chir Trans* **27**, 435-498.8 (1844).
6. Kyle, R.A. Multiple myeloma: an odyssey of discovery. *Br. J. Haematol* **111**, 1035-1044 (2000).
7. Kyle, R.A. Henry Bence Jones--physician, chemist, scientist and biographer: a man for all seasons. *Br. J. Haematol* **115**, 13-18 (2001).
8. Dalrymple, J. On the microscopical character of mollities ossium. *Doublin Quarterly Journal of Medical Science* **2**, 85-95 (1846).
9. Kyle, R.A. & Rajkumar, S.V. Multiple myeloma. *Blood* **111**, 2962-2972 (2008).
10. Bayne-Jones, S. & Wright Wilson, D. Immunological reactions of Bence-Jonesproteins. II. Differences between Bence-Jones proteins from various sources. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **33**, 119-25 (1922).
11. Korngold, L. & Lipari, R. Multiple-myeloma proteins. III. The antigenic relationship of Bence Jones proteins to normal gammaglobulin and multiple-myeloma serum proteins. *Cancer* **9**, 262-272 (1956).
12. Edelman, G.M. & Gally, J.A. The nature of Bence-Jones proteins. Chemical similarities to polypeptide chains of myeloma globulins and normal gamma-globulins. *J. Exp. Med* **116**, 207-227 (1962).
13. Holland, J.F. et al. A Controlled Trial of Urethane Treatment in Multiple Myeloma. *Blood* **27**, 328 -342 (1966).
14. Blokhin, N., Larionov, L., Perevodchikova, N., Chebotareva, L. & Merkulova, N. Clinical experiences with sarcolysin in neoplastic diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* **68**, 1128-1132 (1958).
15. Alexanian, R. et al. Treatment for multiple myeloma. Combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. *JAMA* **208**, 1680-1685 (1969).
16. Bladé, J. et al. High-dose therapy autotransplantation/intensification vs continued standard chemotherapy in multiple myeloma in first remission. Results of a non-randomized study from a single institution. *Bone Marrow Transplant* **26**, 845-849 (2000).
17. Attal, M. et al. Single versus double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N. Engl. J. Med* **349**, 2495-2502 (2003).
18. Maloney, D.G. et al. Allografting with nonmyeloablative conditioning following cytoreductive autografts for the treatment of patients with multiple myeloma. *Blood* **102**, 3447 -3454 (2003).
19. Singhal, S. et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N. Engl. J. Med* **341**, 1565-1571 (1999).
20. Rajkumar, S.V. & Kyle, R.A. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings* **80**, 1371 -1382 (2005).
21. Cavo, M. Proteasome inhibitor bortezomib for the treatment of multiple myeloma. *Leukemia* **20**, 1341-1352 (2006).
22. Schroeder, H.W., Jr & Cavacini, L. Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy*

- Clin. Immunol* **125**, S41-52 (2010).
23. Fossati, V., Kumar, R. & Snoeck, H.-W. Progenitor Cell Origin Plays a Role in Fate Choices of Mature B Cells. *The Journal of Immunology* **184**, 1251 -1260 (2010).
 24. Mårtensson, I.-L., Keenan, R.A. & Licence, S. The pre-B-cell receptor. *Curr. Opin. Immunol* **19**, 137-142 (2007).
 25. Herzog, S., Reth, M. & Jumaa, H. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol* **9**, 195-205 (2009).
 26. Chung, J.B., Silverman, M. & Monroe, J.G. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol* **24**, 343-349 (2003).
 27. Oracki, S.A., Walker, J.A., Hibbs, M.L., Corcoran, L.M. & Tarlinton, D.M. Plasma cell development and survival. *Immunol. Rev* **237**, 140-159 (2010).
 28. LeBien, T.W. & Tedder, T.F. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* **112**, 1570-1580 (2008).
 29. Ollila, J. & Vihinen, M. B cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol* **37**, 518-523 (2005).
 30. LeBien, T.W. Fates of human B-cell precursors. *Blood* **96**, 9-23 (2000).
 31. O'Connell, F.P., Pinkus, J.L. & Pinkus, G.S. CD138 (Syndecan-1), a Plasma Cell Marker. *American Journal of Clinical Pathology* **121**, 254 -263 (2004).
 32. Lin, P., Owens, R., Tricot, G. & Wilson, C.S. Flow Cytometric Immunophenotypic Analysis of 306 Cases of Multiple Myeloma. *American Journal of Clinical Pathology* **121**, 482 -488 (2004).
 33. Elenius, K., Salmivirta, M., Inki, P., Mali, M. & Jalkanen, M. Binding of human syndecan to extracellular matrix proteins. *J. Biol. Chem* **265**, 17837-17843 (1990).
 34. Mali, M., Jaakkola, P., Arvilommi, A.M. & Jalkanen, M. Sequence of human syndecan indicates a novel gene family of integral membrane proteoglycans. *J. Biol. Chem* **265**, 6884-6889 (1990).
 35. Lima, M. et al. Immunophenotypic aberrations, DNA content, and cell cycle analysis of plasma cells in patients with myeloma and monoclonal gammopathies. *Blood Cells Mol. Dis* **26**, 634-645 (2000).
 36. Thomas, M.L. The leukocyte common antigen family. *Annu. Rev. Immunol* **7**, 339-369 (1989).
 37. Kumar, S., Rajkumar, S.V., Kimlinger, T., Greipp, P.R. & Witzig, T.E. CD45 expression by bone marrow plasma cells in multiple myeloma: clinical and biological correlations. *Leukemia* **19**, 1466-1470 (2005).
 38. Joshua, D. et al. The labelling index of primitive plasma cells determines the clinical behaviour of patients with myelomatosis. *Br. J. Haematol* **94**, 76-81 (1996).
 39. Adam, Z., Hájek, R., Ščudla, V. & Vorlíček, J. *Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie*. (Masarykova univerzita: Brno-Kraví hora, 1999).
 40. Cao, W. et al. Instability of Immunophenotype in Plasma Cell Myeloma. *American Journal of Clinical Pathology* **129**, 926 -933 (2008).
 41. Medina, F., Segundo, C., Campos-Caro, A., González-García, I. & Brieva, J.A. The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood* **99**, 2154 -2161 (2002).
 42. Almeida, J. et al. High-sensitive immunophenotyping and DNA ploidy studies for the investigation of minimal residual disease in multiple myeloma. *British Journal of Haematology* **107**, 121-131 (1999).
 43. Rawstron, A.C. et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* **93**, 431-438 (2008).
 44. Harada, H. et al. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood* **81**, 2658 -2663 (1993).
 45. Zandecki, M. et al. CD19 and immunophenotype of bone marrow plasma cells in

- monoclonal gammopathy of undetermined significance. *J Clin Pathol* **48**, 548-552 (1995).
46. Ocqueteau, M. et al. Expression of the CD117 antigen (c-Kit) on normal and myelomatous plasma cells. *Br. J. Haematol* **95**, 489-493 (1996).
 47. Jourdan, M. et al. An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood* **114**, 5173-5181 (2009).
 48. Chu, V.T., Beller, A., Nguyen, T.T.N., Steinhäuser, G. & Berek, C. The long-term survival of plasma cells. *Scand. J. Immunol* **73**, 508-511 (2011).
 49. Odendahl, M. et al. Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood* **105**, 1614 - 1621 (2005).
 50. Hauser, A.E. et al. Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response. *J. Immunol* **169**, 1277-1282 (2002).
 51. Minges Wols, H.A., Underhill, G.H., Kansas, G.S. & Witte, P.L. The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity. *J. Immunol* **169**, 4213-4221 (2002).
 52. Cassese, G. et al. Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *J. Immunol* **171**, 1684-1690 (2003).
 53. Okada, M. et al. B cell growth factors and B cell differentiation factor from human T hybridomas. Two distinct kinds of B cell growth factor and their synergism in B cell proliferation. *J. Exp. Med* **157**, 583-590 (1983).
 54. Kikutani, H. et al. Effect of B cell differentiation factor (BCDF) on biosynthesis and secretion of immunoglobulin molecules in human B cell lines. *J. Immunol* **134**, 990-995 (1985).
 55. Kawano, M.M., Mihara, K., Huang, N., Tsujimoto, T. & Kuramoto, A. Differentiation of early plasma cells on bone marrow stromal cells requires interleukin-6 for escaping from apoptosis. *Blood* **85**, 487-494 (1995).
 56. Jégou, G., Bataille, R. & Pellat-Deceunynck, C. Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood* **97**, 1817 -1822 (2001).
 57. Kawano, M. et al. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* **332**, 83-85 (1988).
 58. Klein, B. et al. Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood* **73**, 517 -526 (1989).
 59. Drexler, H.G. *Guide to leukemia-lymphoma cell lines*. (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures: Braunschweig, Germany, 2010).
 60. Schaeffer, W.I. Terminology associated with cell, tissue, and organ culture, molecular biology, and molecular genetics. Tissue Culture Association Terminology Committee. *In Vitro Cell. Dev. Biol* **26**, 97-101 (1990).
 61. Masters, J.R. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nat Rev Cancer* **2**, 315-319 (2002).
 62. Osgood, E.E. & Brooke, J.H. Continuous tissue culture of leukocytes from human leukemic bloods by application of gradient principles. *Blood* **10**, 1010-1022 (1955).
 63. Nelson-Rees, W.A. & Flandermeyer, R.R. HeLa cultures defined. *Science* **191**, 96-98 (1976).
 64. Pulvertaft, J.V. Cytology of Burkitt's tumour (African lymphoma). *Lancet* **1**, 238-240 (1964).
 65. Matsuoka, Y., Moore, G.E., Yagi, Y. & Pressman, D. Production of free light chains of immunoglobulin by a hematopoietic cell line derived from a patient with multiple myeloma. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* **125**, 1246-1250 (1967).
 66. Nilsson, K., Bennich, H., Johansson, S.G. & Pontén, J. Established immunoglobulin

- producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE myeloma patient. *Clin. Exp. Immunol* **7**, 477-489 (1970).
67. Sakai, A. et al. Establishment of an HS23 stromal cell-dependent myeloma cell line: fibronectin and IL-6 are critical. *Int. J. Hematol* **92**, 598-608 (2010).
 68. Zhang, X. et al. Reproducible obtaining of human myeloma cell lines as a model for tumor stem cell study in human multiple myeloma. *Blood* **83**, 3654 -3663 (1994).
 69. Epstein, M.A., Achong, B.G. & Barr, Y.M. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* **1**, 702-703 (1964).
 70. Dolcetti, R., Guidoboni, M., Gloghini, A. & Carbone, A. EBV-Associated Tumors: Pathogenetic Insights for Improved Disease Monitoring and Treatment. *Current Cancer Therapy Reviews* **1**, 27-44 (2005).
 71. Drexler, H.G., Dirks, W.G., Matsuo, Y. & MacLeod, R.A.F. False leukemia-lymphoma cell lines: an update on over 500 cell lines. *Leukemia* **17**, 416-426 (2003).
 72. Drexler, H.G. *The Leukemia-Lymphoma Cell Line Factsbook*. (Academic Press: 2001).
 73. Bataille, R. et al. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of „many and multiple myelomas“ and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica* **91**, 1234-1240 (2006).
 74. Kovarova, L. et al. Phenotype of plasma cells in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *neo* **56**, 526-532 (2009).
 75. Mahmoud, M.S., Ishikawa, H., Fujii, R. & Kawano, M.M. Induction of CD45 Expression and Proliferation in U-266 Myeloma Cell Line by Interleukin-6. *Blood* **92**, 3887 -3897 (1998).
 76. Hata, H. et al. Interleukin-6 gene expression in multiple myeloma: a characteristic of immature tumor cells. *Blood* **81**, 3357 -3364 (1993).
 77. Kuranda, K. et al. A subpopulation of malignant CD34+CD138+B7-H1+ plasma cells is present in multiple myeloma patients. *Exp. Hematol* **38**, 124-131 (2010).